



Université des Antilles et de la Guyane
Faculté de Sciences exactes et naturelles
École doctorale pluridisciplinaire

Thèse pour le doctorat en **Sciences de la vie**

DEBIBAKAS Sarah

Impact de la diversité génétique du Sugarcane yellow leaf virus sur les déterminismes de résistance de la canne à sucre à la feuille jaune

Sous la direction de : Jean Heinrich DAUGROIS et de

Juliette SMITH-RAVIN

Soutenue publiquement le 21 Novembre 2012

Jury :

Jean VAILLANT, Professeur, Université des Antilles et de la Guyane	Président de jury
Francis QUETIER, Professeur émérite, Université d'Evry	Rapporteur
Frédéric REVERS, Chargé de recherche HDR, Université Bordeaux 1	Rapporteur
Jean Heinrich DAUGROIS, Chercheur HDR, CIRAD	Co-directeur de thèse
Juliette SMITH-RAVIN, Maître de conférence HDR, Université des Antilles et de la Guyane	Co-directeur de thèse

A mes grands-parents,

à mes parents,

à mes frères

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Conseil Régional de la Guadeloupe, pour m'avoir accordé une bourse doctorale qui m'a permis d'effectuer mes travaux de recherche dans de bonnes conditions.

Je remercie M. Francis Quetier et M. Frédéric Revers qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également les autres membres du jury : Mme Juliette Smith-Ravin, M. Jean Vaillant et M. Jean Heinrich Daugrois qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse : M. Jean Heinrich Daugrois, Mme Juliette Smith-Ravin, M. Laurent Costet, M. Jean-Yves Hoareau et M. Philippe Rott qui ont su me guider et me conseiller au long de ces années de recherche.

Je remercie particulièrement M. Jean Heinrich Daugrois qui a toujours été disponible et patient, et m'a toujours bien conseillée. Je le remercie particulièrement pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début de notre collaboration en janvier 2008 et pour toute la compréhension dont il a fait preuve.

Je remercie également mon co-directeur de thèse Madame Juliette Smith-Ravin qui me suit depuis le début de mes études à l'université pour tous ses conseils avisés et qui a accepté de co-diriger cette thèse malgré toutes ses obligations.

J'ai une profonde pensée pour Mme Sarah Salibur qui a toujours répondu avec diligence, bonne humeur et efficacité à mes nombreuses demandes.

Je remercie tout le personnel du CIRAD Guadeloupe et en particulier de la station de Roujol qui m'a accueillie parmi eux. Je ne peux malheureusement pas remercier chacun individuellement.

Je tiens à remercier particulièrement Nadia Adjanoh-Lubin pour sa disponibilité, sa bonne humeur et pour avoir accepté de passer autant de temps avec moi dans les champs de cannes à sucre de la station. Je n'oublie pas non plus tout le temps passé ensemble dans les laboratoires et sous la serre. Tu as su faire de ces longs moments de travail des instants privilégiés que je n'oublierai pas.

Je remercie M. Jean-Yves Hoareau pour sa patience et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et ce depuis mon stage de Master.

Je remercie Danièle Roques d'avoir réalisé les croisements et de m'avoir fourni le matériel végétal nécessaire à la bonne réalisation de cette étude.

Je remercie les filles du laboratoire: Rosiane, Jocelyne, Patricia, Chantal et Marie-Claire d'abord de m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir initiée aux techniques que j'ai découvert.

Je remercie tous les ouvriers et les techniciens de la station qui se sont occupés du matériel végétal dont j'ai eu besoin au cours de ces années passées au CIRAD.

J'ai bien sûr une pensée pour Mme Perrot pour tout ce qu'elle fait notamment la confiture de surelle dont elle a le secret.

Je remercie Georges Gélabale pour m'avoir aidé pendant mon stage de Master, pour sa gentillesse et tous ces agréables moments d'échanges au cours de ces années.

J'ai une grande pensée pour Carine Edon, qui m'a accueillie dans son bureau à mon arrivée à Roujol et a grandement contribué à mon intégration sur la station.

Je remercie particulièrement Alice Némorin pour toutes les discussions, les encouragements et les conseils avisés qu'elle a su me donner.

J'ai une grande pensée pour Solen Rocher pour sa bonne humeur, sa gentillesse et son calme à toute épreuve.

J'ai une pensée pour tous les stagiaires que j'ai pu rencontrer au CIRAD: Audrey Paulo, Fiorella Fanton Aita qui sait si bien faire les gâteaux à l'igname ...

Je remercie Emmanuel Fernandez du CIRAD Montpellier pour avoir accepté de faire le déplacement en Guadeloupe afin de me former aux techniques de biologie moléculaire, pour sa bonne humeur et ses conseils au cours de ces journées enrichissantes passées au laboratoire.

Je remercie également les membres du laboratoire Guillot à Neufchâteau: Marie, Isabelle, Lydiane, Benoît... qui m'ont acceptée parmi eux et ont su me guider pendant mes expérimentations sur place.

J'adresse de vifs remerciements à tous les enseignants qui m'ont formée au cours de ma scolarité et qui m'ont aidé et encouragé à continuer mes études.

Je remercie Manuella Corial pour son amitié, sa gentillesse, son attention et pour avoir accepté d'entendre parler pendant des heures de ce sujet de thèse. J'ai une pensée pour Cindy Corial qui s'est toujours intéressée à ce travail.

Je remercie Marie-Claude Durpes, que j'ai retrouvée avec beaucoup de plaisir pour m'avoir prodigué tous ces conseils sur la conduite de la thèse.

Je remercie Séverine Miatti-Tormin, Vanessa Benoit, Fritz Mounsamy, Ericka et Elodie Disa, Maryem Zandronis, Laura Bon et Elvire Couchy pour toutes nos discussions et les sorties que nous avons pu faire.

Je remercie en particulier mes parents sans qui je ne serais pas arrivée jusqu'ici. Ils ont toujours su m'écouter, m'encourager et me soutenir jusqu'au bout. Ils ont également su me guider et me donner tous les moyens dont j'ai eu besoin pour atteindre mes objectifs. Ils ont été pour moi de vrais modèles de droiture et de persévérance.

J'ai une profonde pensée pour mes grands-parents qui ne sont pas tous présents aujourd'hui mais qui ont toujours été des modèles de courage et de réussite.

Je remercie tous les membres de ma famille qui se sont toujours intéressés à mon avenir et pour tous ces encouragements au cours de ces années d'étude. Je les remercie également de la compréhension dont ils ont su faire preuve au cours de ces trois années.

Je finirai par des remerciements à tous ceux que j'ai pu croiser pendant ces années et qui se sont intéressés à mon sujet de recherche.

'Pour aller de l'avant il ne faut pas refaire l'histoire, mais innover. Nous devons ajouter quelque chose à l'héritage de nos ancêtres' Mahâtma Gandhi.

Résumé

La canne à sucre (*Saccharum* spp.) est une graminée saccharifère couvrant 70% de la production mondiale de sucre et 20% de la production mondiale d'éthanol. Les variétés modernes possèdent une structure génétique complexe, aneuploïde, hautement polyploïde et d'origine bispécifique. Des études récentes ont permis de mettre en évidence un déséquilibre de liaison important favorable à la réalisation d'études d'associations pan-génomiques. La feuille jaune de la canne à sucre est une maladie virale émergente dont l'agent causal est le *Sugarcane yellow leaf virus* (*Polerovirus*, famille des *Luteoviridae*). Huit génotypes viraux ont été décrits à ce jour: BRA, CHN 1, CHN 2, CUB, HAW, IND, PER et REU. Seuls trois d'entre eux, différenciables par RT-PCR, sont présents en Guadeloupe: BRA-PER, CUB et REU. Le support génétique de la résistance de la canne à sucre à la feuille jaune est encore mal connu tout comme l'impact de la diversité du pathogène sur la résistance de l'hôte. Les objectifs de l'étude sont d'évaluer : 1/ la possibilité de marquer la résistance de la canne à sucre au SCYLV, 2/ l'impact de la diversité de l'agent pathogène sur la résistance de la canne à sucre à la maladie.

Les études d'association, décrites ici, ont été effectuées sur un panel diversifié de 189 variétés de canne à sucre, expérimenté dans deux essais successifs (2005 et 2007) dans un dispositif en trois blocs complets, randomisés. Ces essais ont été suivis pendant trois ans. Pour optimiser l'étude quatre caractéristiques phénotypiques ont été évaluées : l'incidence et la densité virale de la maladie dans les feuilles et dans les tiges des variétés étudiées. Ces données ont été associées à plus de 4000 marqueurs AFLP et DArT à l'aide du logiciel Tassel (V3.0) en utilisant le modèle linéaire généralisé (GLM) et le modèle linéaire mixte (MLM).

Cette étude d'association m'a permis d'identifier six marqueurs significatifs associés à la résistance au SCYLV. Les phénotypes obtenus à l'aide des échantillons de feuilles ont permis d'identifier les six marqueurs. En revanche, à partir des échantillons de tiges, seuls trois des six marqueurs sont significatifs. De plus, quatre des six marqueurs sont plus ou moins liés aux interactions génotype x environnement existant entre les deux essais.

Parmi les 189 variétés de canne à sucre, 40 variétés représentant la diversité des phénotypes observés ont été utilisées pour étudier l'incidence du SCYLV et des génotypes. Ces mesures ont été effectuées sur deux cycles de culture du 2^{ème} essai. A partir de ces variétés dix croisements biparentaux ont donné suffisamment de descendants pour réaliser deux essais successifs. Ces descendances ont été analysées en première repousse quant à leur infection naturelle par le SCYLV

et les différents génotypes. L'héritabilité au sens strict (h^2) de cette résistance a été déterminée par régression de la valeur des géniteurs sur la valeur des descendances.

Les génotypes viraux présents dans ces 40 variétés ont permis de conclure que le spectre de variétés infectées par le génotype CUB englobe ceux des génotypes BRA-PER et REU. De plus, le génotype CUB est responsable pour 87% de la variation de l'incidence observée dans l'essai. L'héritabilité (h^2) de la résistance obtenue pour le paramètre de l'incidence du SCYLV est de 0,35 ($P=0,012$). En ce qui concerne l'incidence des génotypes viraux, nous avons obtenu une héritabilité de 0,36 pour CUB ($P=0,005$), 0,28 pour REU ($P=0,062$) et 0,25 pour BRA-PER. ($P = 0,008$). Le caractère de résistance au SCYLV semble être hérité du géniteur mâle, le géniteur femelle n'ayant pas d'impact significatif sur la valeur des descendances.

Ces travaux m'ont permis d'identifier des marqueurs de résistance au SCYLV ou du moins à certains génotypes de ce virus. De plus, la résistance de la plante aux différents génotypes viraux présents est en partie transmise aux descendances. Cette étude montre qu'il est donc envisageable de réaliser la création variétale assistée par marqueur concernant ce caractère.

Abstract

Sugarcane (*Saccharum spp.*) is a sacchariferous grass (*Poaceae*) covering 70% of world sugar production and 20% of ethanol global production. Modern varieties have a complex genetic structure: aneuploid and highly polyploid with bi-specific origin. Recent studies have revealed significant linkage disequilibrium (LD) in favour of the realization of genome-wide association studies (GWAs). Yellow leaf of sugarcane is an emerging viral disease whose causal agent is the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) (*Polerovirus*, *Luteoviridae* family). Eight SCYLV genotypes have been described up to date: BRA, CHN 1, CHN 2, CUB, HAW, IND, PER and REU. Only three of them, distinguishable by RT-PCR, are present in Guadeloupe: BRA-PER, CUB and REU. Genetic contribution to yellow leaf resistance is still unknown as the impact of the pathogen diversity on host resistance. The objectives of the study are to assess: 1 / the possibility to find markers for the resistance of sugarcane to SCYLV, 2 / the impact of the pathogen diversity on resistance of sugarcane to this disease.

Association studies described herein were performed on a panel of 189 diverse varieties of sugarcane, tested in two successive trials (2005 and 2007) in a three complete block randomized design. The trials were followed for three years. To optimize the study, four phenotypic characteristics were evaluated for all varieties: the SCYLV incidence and density in leaf and stalk. These data were combined to more than 4000 AFLP and DArT markers using the Tassel software (v 3.0) with the generalized linear model and the compressed mixed linear model.

Thanks to this association study, I identified six significant markers associated with the resistance to SCYLV. The phenotyping data obtained with the leaf samples resulted in the identification of six markers. However, from stalk samples, only three of the six markers are significant. In addition, four of the six markers are more or less related to genotype x environment interactions between the two trials.

Of the 189 varieties of sugarcane, 40 varieties representing the diversity of the phenotypes have been used to study the incidence of SCYLV and its genotypes. These measurements were performed on two crop cycles of the second trial. From these varieties ten biparental crosses gave enough seedlings to perform two successive trials. The progenies were analyzed in 1st ratoon for their natural infection by the SCYLV and its genotypes. The narrow-sense heritability (h^2) of resistance was determined by regression of the value of the parents on the value of the offspring.

The SCYLV genotypes present in the 40 varieties showed that the spectrum of varieties infected with genotype CUB includes those of genotypes BRA-PER and REU. In addition, the genotype

CUB is responsible for 87% of the variation of the incidences observed in this panel. The heritability (h^2) of SCYLV incidence was 0.35 ($P = 0.012$). Regarding the incidence of viral genotypes, we obtained a heritability of 0.36 for CUB ($P = 0.005$), 0.28 for REU ($P = 0.062$) and 0.25 for BRA-PER ($P = 0.008$). The resistance trait to SCYLV appears to be inherited from the male parent. The female parent has no significant impact on the value of the progenies tested.

This work enabled me to identify markers of resistance to SCYLV or at least to some genotypes of this virus. In addition, the plant resistance to the different SCYLV genotypes presents is at least partly transmitted to offspring. This study shows that it is therefore possible to achieve marker-assisted breeding for this character.

Table des matières

INTRODUCTION	14
I/ La canne à sucre	15
1.1/ Origine et diffusion	15
1.2/ Description de la plante.....	16
1.3/ Génétique de la canne à sucre	17
1.4/ Sélection variétale.....	19
1.5/Les variétés et leur nomenclature	20
1.6/Génétique d'association chez la canne à sucre	21
II/ La feuille jaune de la canne à sucre	22
2.1/ Les maladies de la canne à sucre	22
2.2/ La feuille jaune :	22
2.3/Le vecteur :	24
2.4/ Le Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV):	27
III/ Objectif et présentation de la thèse	29
Partie 1: Etude d'association pangénomique	30
I/ Introduction	30
II/ Matériel et méthode	31
2.1/ Matériel végétal	31
2.2/ Echantillonnage	33
2.3/ Diagnostique viral par immuno-empreinte de feuilles et de tiges (TBIA).....	34
2.4/ Données recueillies.....	35
2.5/ Analyses statistiques des données.....	36
2.6/ L'héritabilité au sens large (H^2)	36
2.7/ Etudes d'associations	37
2.8/ Recherche de gènes impliqués dans la résistance aux maladies	38
III/ Résultats	39
3.1/ Analyse phénotypique	39
3.2/ Génétique d'association	41
IV/ Discussion	47
V/ Conclusion	50
Partie 2: Etude de la résistance aux SCYLVs et de sa transmission.....	51
I/ Introduction	51
II/ Matériel et méthode	52
2.1/ Matériel végétal	52
2.2/ Diagnostique viral par immuno-empreinte de feuilles	55
2.3/ Diagnostique des différents génotypes viraux du SCYLV.....	55
2.4/ Traitement des données	58
III/ Résultats	59
3.1/ Essai 40 géniteurs potentiels	59
3.2/ Essai sur les descendancees	61
IV/ Discussion	65
V/ Conclusion	68

Conclusion	70
Bibliographie.....	72
Travaux publiés	80

Figures

Figure 1 : Diffusion de la canne à sucre à partir de la Nouvelle Guinée.....	16
Figure 2 : Dessin d'une canne à sucre entière et détail d'une tige.....	17
Figure 3 : Schéma de nobilisation de la canne à sucre (Robert Domaingue CIRAD).....	19
Figure 4 : Feuilles de canne à sucre atteintes par le SCYLV	23
Figure 5: Présence du SCYLV dans les cannes à sucre du monde. Les carrés rouges désignent la présence du virus et les blancs son absence. Les nombres indiquent l'année où les tests ont été conduits. (Ewald Komor, 2010)	23
Figure 6 : Cycle de reproduction de pucerons (d'après A. M. Varela icipe).....	24
Figure 7 : Pucerons non ailés (A) et puceron ailé (B) adultes (Jean-Heinrich Daugrois).....	25
Figure 8 : Trajet du virus dans un puceron d'après Gildow 1987	26
Figure 9 : Photo de particules virales du SCYLV (B.E.L Lockhart)	27
Figure 10 : Détail de la constitution du SCYLV et positions des amorces permettant sa détection (Y. Abu Ahmad 2006).	28
Figure 11: Feuille prélevée.....	33
Figure 12 : Immuno-empreintes de parties centrales de feuilles de canne à sucre. A : feuilles négatives B : feuilles positives ; les particules virales sont colorées en bleu (photos : C. Edon)	35
Figure 13: Moyennes prédites en canne plantée (CP) et en seconde repousse (R2) pour les deux types d'échantillonnage de chaque essai et pour l'incidence (I) et la densité du virus (D)	39
Figure 14: Distributions des valeurs de P des 2 valeurs extrêmes du ratio médian pour les graphiques PP effectuées pour les modèles MLM (A) et GLM (B). Les distributions des valeurs de P sont effectuées en réalisant le graphique des valeurs de P observées sur les valeurs de P attendues cumulées (en suivant une échelle de $-\log_{10}$). Une distribution uniforme est indiquée par la diagonale attendue.	42
Figure 15: Marqueurs DArTs alignés au génome du <i>Sorghum bicolor</i> et les gènes les entourant sur une distance de 100kb. Les gènes potentiellement liés à l'infection par le SCYLV de la canne à sucre sont en couleur. ..	46
Figure 16: Plan des champs de descendance des essais 1 et 2.....	54
Figure 17: Gel d'agarose montrant l'estimation de l'incidence chez les génotypes viraux étudiés en fonction de la densité des bandes obtenues	57
Figure 18 : Incidence moyenne du SCYLV et de ses génotypes présents en Guadeloupe pour les 40 géniteurs potentiels (R2 et R3).....	60
Figure 19: Incidence moyenne du SCYLV et de ses génotypes présents en Guadeloupe pour les descendance (essais 1 et 2)	61
Figure 20 : Taux d'infection du SCYLV et de ses trois génotypes mesurés chez les géniteurs et les descendance pour les 10 croisements étudiés	63

Liste des sigles

ACP : Analyse en composantes principales

AFLP: Amplified fragment-length polymorphism

BIC: Bayesian information criterion

BLUP: Best linear unbiased prediction

BSA: Bovine serum albumin

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

cM: Centimorgan

DArT: Diversity arrays technology

DL: Déséquilibre de liaison

FAO: Food and agriculture organization

GLM: Generalized linear model

GWAs: Genome wide association studies

GWER: Genome wide error rate

MLM: Mixed linear model

ODEADOM: Office de développement de l'économie agricole des Départements d'Outre-Mer

ORF: Open reading frame

pb: paire de bases

QTL: Quantitative trait loci

RAPD: Random amplification of polymorphic DNA

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

SSR: Simple sequence repeats

TBS: Tris buffered saline

UTR: Untranslated region

INTRODUCTION

La canne à sucre est une plante tropicale et subtropicale herbacée saccharifère du genre *Saccharum* appartenant à la famille des *Poaceae*. Il s'agit d'une des rares graminées cultivées pour sa tige. Cette plante est cultivée dans plus de 90 pays et est la première production mondiale en volume avec plus de 1,7 milliards de tonnes produits en 2010. Cela représente près de 23% de la masse totale produite en agriculture. Le sucre produit à partir de la culture de la canne à sucre représente 65 à 70% de la production mondiale en 2010 (FAO).

La canne à sucre est une plante semi pérenne dont la récolte se fait de février à juin aux Antilles. La canne à sucre occupe environ un tiers de la superficie agricole utilisée en Guadeloupe. La quantité de cannes récoltées en 2010 s'est élevée à 737 010 tonnes. La part de la canne à sucre livrée dans les deux sucreries est de 677 432 tonnes soit plus de 90% du tonnage global (ODEADOM). La production est destinée à la fabrication de sucre, de rhum traditionnel de sucrerie (produit à partir de la mélasse) et de rhum agricole, issu de la fermentation directe du jus de canne à sucre.

Tableau 1: Production de canne à sucre et de sous produits de la canne à sucre en Guadeloupe de 2007 à 2010 (ODEADOM).

	2007	2008	2009	2010
Production de canne (t)	785 364	689 894	699 151	737 010
Production de sucre (t)	80 200	63 450	55 601	59 986
Production de rhum (HAP)	74 524	74 183	76 291	64 832
dont rhum agricole	29 213	32 080	31 370	27 126

HAP : Hectolitre d'Alcool Pur

Malheureusement, cette importante culture subit les attaques de nombreux ravageurs (rats, insectes...) et de maladies fongiques, bactériennes ou virales telles que la feuille jaune.

I/ La canne à sucre

1.1/ Origine et diffusion

La canne à sucre est connue depuis la préhistoire (-8000) et serait originaire de Nouvelle-Guinée. Sa culture s'est progressivement étendue aux îles avoisinantes, puis a gagné l'Inde et la Chine. L'extraction de sucre de canne est attestée en Chine environ six siècles avant Jésus-Christ. La production de sucre existait en Inde 3000 ans avant Jésus Christ. C'est l'expédition d'Alexandre le Grand jusqu'à l'Inde aux alentours de -325 qui la fit connaître la première fois aux Européens. (Figure 1)

À partir du VII^e siècle, les arabes l'introduisirent depuis la Perse dans l'ensemble des territoires qu'ils occupèrent et jusqu'en Espagne au cours du VIII^e siècle. Ils ont acclimaté la canne à sucre dans les pays méditerranéens, adopté les techniques indiennes de production de sucre et les ont affinées, les transformant alors en une grande industrie. L'Occident découvre le sucre de canne chez les Arabes lors des croisades (XI^e) et le fait apporter notamment en Italie, en Grèce et dans le sud de la France. Produit exotique et rare, il est d'abord réservé aux apothicaires et aux élites chez qui il est utilisé comme monnaie d'échange, épice et médicament jusqu'au XVII^e siècle, ne devenant une nourriture qu'au XVIII^e siècle.

Au XVII^e siècle, la culture de la canne est généralisée dans les colonies françaises.

La canne à sucre fut introduite dans les Antilles par Christophe Colomb lors de son second voyage en 1493, où, grâce au climat favorable, sa culture a rapidement prospéré. Dès son second voyage, en 1493, il introduisit à Hispaniola (Saint-Domingue) des plants de canne à sucre en provenance des Canaries. Au début du XVII^e siècle, les colonies françaises des Antilles sont des colonies de peuplement, et les premières plantations de canne ne commencent qu'en 1643 après l'échec de la culture du tabac.

La propagation de la canne à sucre, qui se fait très facilement par boutures, atteint rapidement toute l'Amérique centrale, notamment Saint-Domingue, Cuba, le Mexique et la Louisiane. Tous les clones initialement introduits provenaient du bassin méditerranéen, mais au cours du XIX^e siècle de nouvelles introductions ont été faites depuis Tahiti et Java.

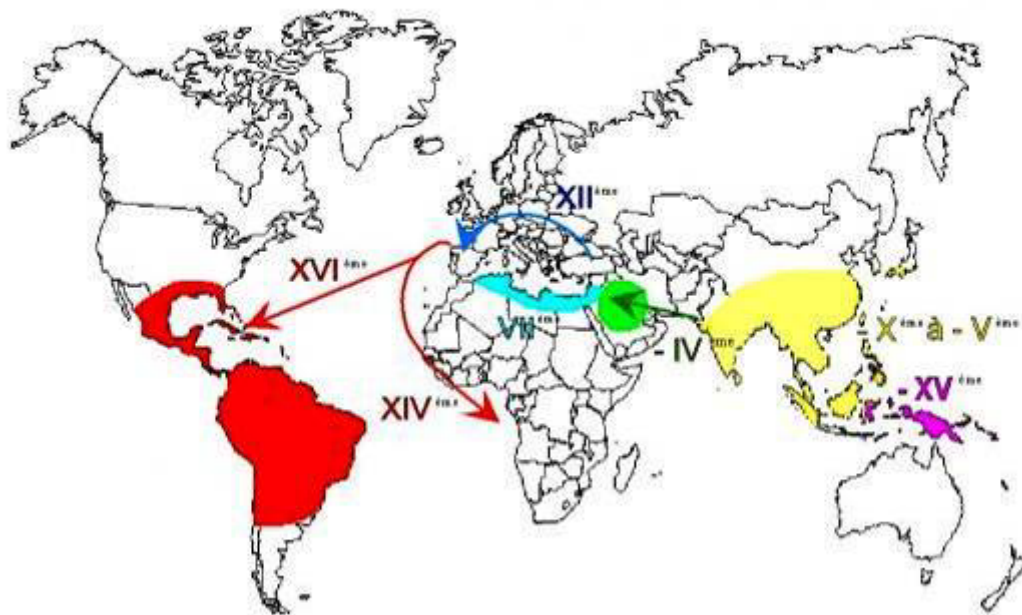


Figure 1 : Diffusion de la canne à sucre à partir de la Nouvelle Guinée

1.2/ Description de la plante

La canne à sucre est une plante facile à cultiver car elle s'adapte à des conditions très variées.

Les tiges de canne à sucre sont composées d'une succession de nœuds et d'entrenœuds. A la récolte, en fonction des variétés et des conditions environnementales, on compte environs 20 à 30 entrenœuds de 10 à 20 centimètres de long chacun. La longueur des tiges peut atteindre 6 mètres. Leur couleur dépend essentiellement de leur variété. Les tiges sont groupées en touffes (effet du tallage) et peuvent comporter entre 5 à 20 cannes à sucre quand elles sont adultes. Leur richesse en sucre peut varier d'une tige à l'autre et du pied au sommet (généralement moins riche). La canne à sucre se multiplie par boutures. Il s'agit d'une partie de la tige qui comporte au moins un bourgeon latéral (œil) et en moyenne 3 ou 4 bourgeons (Figure 2).

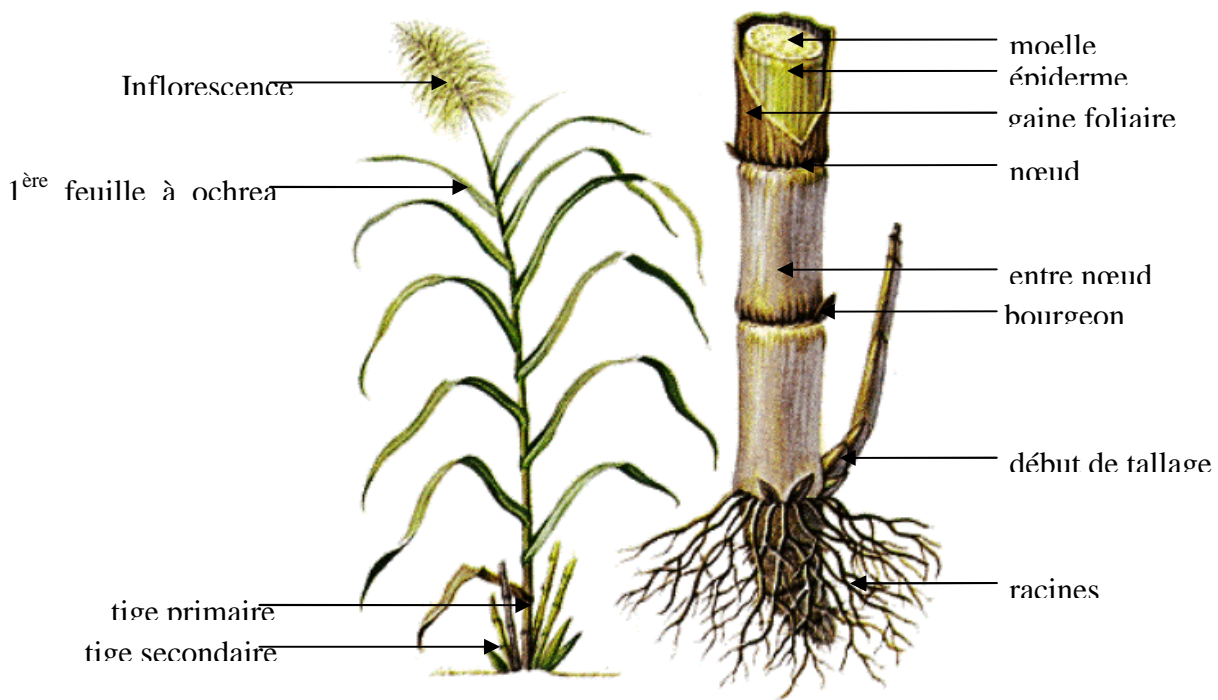


Figure 2 : Dessin d'une canne à sucre entière et détail d'une tige

Les racines de canne à sucre ont deux rôles : l'absorption et la fixation. La majorité des racines se trouvent à moins de 60 cm de profondeur. Les racines sont très sensibles à l'excès d'humidité, au manque d'air et à la température du sol.

Les feuilles sont alternées, et sont composées d'une gaine et d'un limbe reliés par une articulation (ochréa) souvent utilisée pour distinguer les variétés.

L'inflorescence (flèche) est une panicule branchue à axe vertical dont la taille, la forme et la couleur dépendent également de la variété cultivée. La « graine » de canne à sucre très petite est en réalité un fruit ou caryopse. Ces graines sont réservées à la création de nouvelles variétés [26].

1.3/ Génétique de la canne à sucre

Le genre *Saccharum* comprend six espèces : *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* et *S. sinense* [17]. Les variétés de canne à sucre modernes sont des hybrides interspécifiques. L'origine génétique de la canne à sucre n'est pas encore véritablement connue. Les espèces *S. robustum* ($2n=60$ à 80) et *S. officinarum* ($2n=80$) sont originaires de la Nouvelle-Guinée. Certaines variétés ont été sélectionnées par l'homme et diffusées ensuite à partir de Tahiti puis des Mascareignes par les français pendant la 2^{ème} moitié du XVIII^e siècle. Les espèces *S. spontaneum* (Asie du sud), *S. barberi* (Inde) et *S. sinense* ($2n=111$ à 120) origine de Chine ont très longtemps été

utilisées localement. Les *S. barberi* ($2n=81$ à 124) ont été introduites par les Arabes au Maroc et par Christophe Colomb aux Antilles. L'espèce *S. edule* ($2n=60-70-80$) est supposé être un hybride entre les genres *S. Miscanthus* et *S. robustum* ou *S. officinarum*. L'espèce *S. edule* ressemble en apparence à *S. robustum* à la différence que son inflorescence est compacte et qu'elle est cultivée comme un légume dans les îles du Pacifique et en Nouvelle Guinée [14].

La découverte de la fertilité des graines de canne à sucre ne s'est faite qu'en 1888 à Java et à la Barbade. Les premiers croisements se sont fait d'abord entre *S officinarum*. Au début du XXe siècle, en Inde et à Java, des géniteurs mâles *S. spontaneum* ($2n=40$ à 128) ont été croisés à des porte-graines *S officinarum*. Les variétés issues de ces croisements ont ensuite été rétro croisées (double backcrossing) avec des *S officinarum*. Ce processus a été nommé 'nobilisation' par Jeswiet [39] et par Stevenson [60] (Figure 3). *S. Spontaneum* a apporté des gènes de résistance aux maladies, mais aussi des critères d'adaptation à une plus grande diversité de conditions de culture (vigueur, tallage, résistance au froid et à la sécheresse, aptitude à la repousse). Les variétés issues de ces croisements ont apporté un énorme gain de productivité en termes de tonnage de sucre à l'hectare. Ces variétés sont les 1ers hybrides et constituent le fond génétique des variétés modernes de canne à sucre. Ces dernières ont une structure génétique complexe. Ces hybrides sont hautement polyploïdes et aneuploïdes (caractérise une cellule qui possède un nombre irrégulier de chromosomes) avec entre 100 et 130 chromosomes. Cette complexité du génome rend l'amélioration variétale difficile. Il existe une tendance à l'ouverture vers les espèces : *S. Miscanthus* ($2n=38$ à 114), *S. Erianthus* ($2n=20-30-40-60$), *S. Narenga* ($2n= 30$) [26].

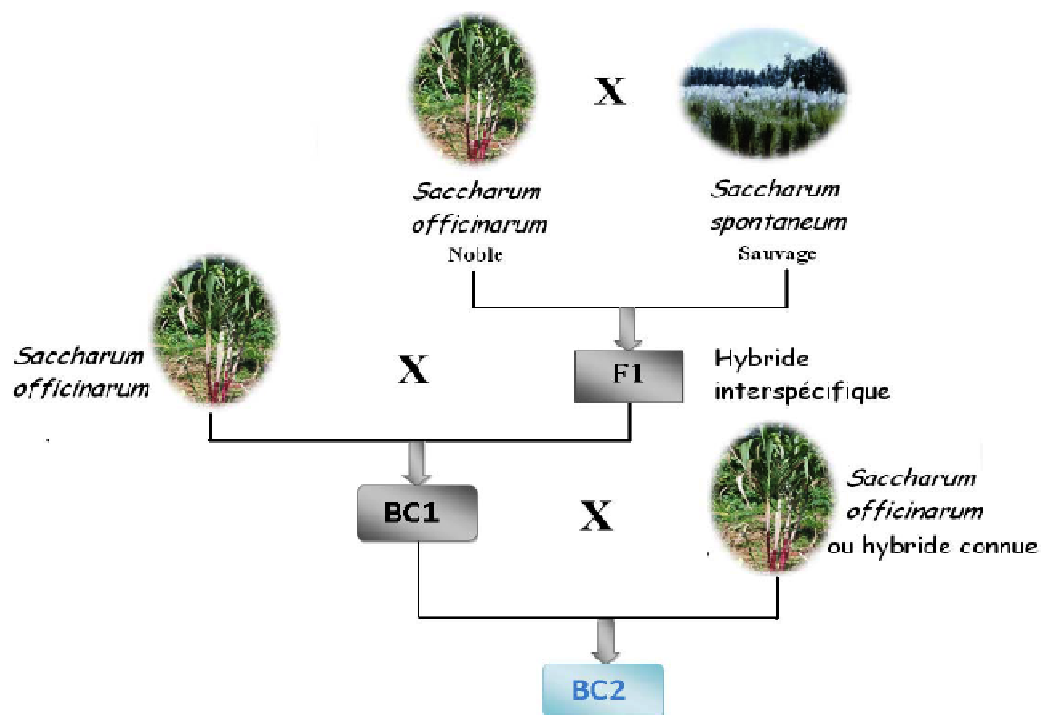


Figure 3 : Schéma de nobilisation de la canne à sucre (Robert Domaingue CIRAD)

Plusieurs cartes génétiques de plusieurs clones ancestraux (*S. spontaneum*, *S. officinarum* et *S. robustum*) et de 5 cultivars modernes ont été générées à l'aide de plusieurs types de marqueurs (RAPD, RFLP, AFLP, SSR). Malgré tout, aucune de ces cartes ne couvre le génome entier de cette plante [56]. Une carte de référence a été développée au CIRAD depuis plusieurs années. Elle a été réalisée à l'aide d'une population issue de l'autofécondation de R570 ([33]; [37]; [57]; [52]). Elle contient actuellement près de 2000 marqueurs de divers types (SSR, RFLP, AFLP et DArT). Cette carte couvre environ 9 000 cM, soit un peu plus de 50 % du génome, dont la taille a été estimée à 17 000 cM [37], pour un génome de 10 000 Mpb [16].

1.4/ Sélection variétale

La création de nouvelles variétés de cannes à sucre est coûteuse et peut durer de 7 à 12 ans. Les croisements variétaux se décident en station en fonction des besoins (vigueurs en champs, richesse en sucre, tallage, résistance aux pathogènes...) mais aussi de la fertilité des géniteurs choisis. Le nombre de géniteurs disponibles au CIRAD Guadeloupe est de plus de 1270 variétés de canne à sucre d'origines diverses et conservées en collection sur 2 hectares. La collection présente au CIRAD Guadeloupe est constituée de canne à sucre d'origines diverses : 42 espèces sauvages (*S. spontaneum*, *S. robustum*), 38 espèces nobles (*S. officinarum*), 12 hybrides interspécifiques naturels

(*S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule*), 5 genres apparentés (*S. Miscanthus*, *S. Erianthus*), 76 hybrides interspécifiques (F1,...) 1098 hybrides commerciaux (*Saccharum spp*) et plus de 50 introductions par an.

Les géniteurs à hybrider sont alors mis en serre contrôlés dans des lanternes d'hybridation. Les nombreuses graines (fuzz) obtenues sont semées en casiers, arrosées et nourries. Chaque graine renferme une combinaison génétique unique qui donnera une plantule différente de ses semblables. A 1 ou 2 mois, les plantules (seedlings) sont repiquées [26]. Les sujets les plus vigoureux (entre 20 000 et 400 000) sont alors plantés en champs sur la station d'hybridation. Chaque touffe correspond alors à une plantule. Il n'y a à ce stade aucune pression de sélection ; la sélection se fait de façon visuelle (robustesse, signes visibles de maladies). Les cannes à sucre sélectionnées seront ensuite plantées en ligne (une ligne de 2m). Des mesures sont à ce moment réalisées concernant la vigueur, le Brix et le rendement. Au fur et à mesure, de nouvelles variétés sont éliminées et la surface occupée par chaque nouvelle variété augmente. Cinq années après le début de la sélection, les variétés retenues sont plantées sur plusieurs stations (2 lignes de 6m) : Grande-Terre, Basse-Terre et Roujol (Petit-Bourg). Des tests concernant le taux de sucre, le rendement, et la résistance aux principales maladies sont effectués sur trois cycles de culture. Une répétition est effectuée en éliminant les variétés ne répondant pas aux critères de sélection et en augmentant la surface de culture (6 lignes de 10m). A près de 12 années, seules une ou deux variétés répondant à tous les critères sont retenues. Ce sont des variétés industrielles. Elles sont ensuite mises en test pendant trois années chez des producteurs.

1.5/Les variétés et leur nomenclature

Les différentes variétés de canne à sucre sont reconnaissables lorsqu'elles sont en culture. La couleur, la forme des bourgeons, la densité, le diamètre des tiges ainsi que les poils, l'ochréa, la gaine, le port des feuilles sont autant de caractères non exhaustifs permettant de différencier une variété de canne à sucre d'une autre.

La numérotation des variétés a tendance à s'uniformiser. Une lettre ou un groupe de lettres indique le pays, la région ou l'organisme de sélection (B : Barbade, PR : Porto-Rico...). Le 1^{er} groupe de chiffre suivant indique l'année de semis de bouture ou de 1^{ère} sélection et le 2^{ème} groupe correspond au numéro d'ordre (B52298, PR61632...). Parfois la variété est renommée au moment où elle est jugée apte à la culture (R570, POJ213...). Quelquefois, les deux lettres du nom

correspondent à un partenariat entre deux pays pour la création d'une nouvelle variété (BJ : Barbade et Jamaïque, HJ : Hawaï et Jamaïque...). L'International Society of Sugar Cane technologists (ISSCT) coordonne et enregistre la répartition des sigles dans le monde [26].

Les variétés sont conservées dans des collections (en champs) plus ou moins importantes dans chaque pays et centre de sélection. La culture in-vitro de canne à sucre permet de conserver des clones sains de variétés présentes sur le terrain (collections et variétés commerciales) et peut servir aussi de première étape de multiplication pour la production de boutures assainies.

1.6/Génétique d'association chez la canne à sucre

L'utilisation de marqueurs moléculaires permet d'améliorer et de faciliter la sélection de nouvelles variétés de canne à sucre. Malheureusement chez cette plante, cet outil est difficilement utilisable à cause de la complexité du génome. Seuls 3 gènes de résistance à des maladies ont été identifiés à ce jour chez la canne à sucre par des analyses QTL sur des descendances issues de croisements biparentaux. Deux sont impliqués dans la résistance à la rouille ([18]; [7]; [52]), et un dans la résistance au yellow spot [5].

De récentes études ont montré que le déséquilibre de liaison (DL) rends possible les études génétiques d'association (association mapping). Le déséquilibre de liaison correspond à l'association non aléatoire d'allèles à des loci distincts dans un échantillon donné de matériel végétal. Les études d'associations pangénomiques permettent, contrairement aux analyses QTL, d'analyser simultanément un grand nombre d'individus portant des allèles différents, correspondant à l'ensemble de la variabilité génétique représentée dans la population étudiée [72]. Afin de limiter le risque d'associations erronées, il est nécessaire de prendre en compte la structure de la population ([8]; [11]). L'étude d'association décrite ici, est basée sur l'utilisation de variétés de canne à sucre représentatives de la diversité génétique exploitée en sélection. Chez la canne à sucre, le déséquilibre de liaison appréciable (5 cM) est dû au faible nombre de recombinaison lors de la réalisation de croisements dans l'histoire de la sélection variétale de cette plante.

II/ La feuille jaune de la canne à sucre

2.1/ Les maladies de la canne à sucre

La canne à sucre est touchée par de nombreuses maladies et ennemis causant des pertes de rendements importants pour le producteur. De ce fait, les échanges internationaux se font en général au travers d'une quarantaine, en collaboration avec des phytopathologistes spécialistes de la canne à sucre.

Les ennemis de cette culture sont en général plus spécifiques de certaines zones géographiques que les maladies. Les espèces et genres sont rarement les mêmes d'une région à l'autre. En 1953 une liste mondiale d'ennemis de cette culture a été établie et comptait 1168 espèces comprenant essentiellement des insectes [26]. Toutes les parties de la plante sont attaquées. Les rats peuvent également causer de grandes pertes dans certains pays car ils s'attaquent généralement à la base de la tige ce qui la casse et la rend irrécupérable pour la production.

Plus de 120 maladies ont été répertoriées sur la canne à sucre [58] dont 66 plus ou moins dommageables pour cette culture. Parmi celles-ci, 25 sont citées en Guadeloupe [58]. Ces maladies peuvent être d'origine virale, bactérienne ou fongique. Ce travail concerne une maladie virale de la canne à sucre : la feuille jaune.

2.2/ La feuille jaune :

La feuille jaune de la canne à sucre est une maladie émergente d'origine virale. Elle a été décrite récemment [59] et identifiée pour la 1^{ère} fois en Guadeloupe en 1996. Il s'agit d'une maladie présente dans la plupart des pays producteurs de canne à sucre. Elle peut entraîner de très lourdes pertes de rendement pour les producteurs. En effet, cette maladie d'origine virale, peut causer jusqu'à 40-60% de perte chez la variété sensible SP71-6163 (10; 63) mais ces résultats ont été revus à la baisse et finalement 20% de pertes ont été enregistrés ([45]; [47]). En Louisiane, 6-14% de pertes ont été enregistrées pour la variété LCP82-89 en fonction du cycle de culture [32]. A Hawaii, des différences de croissance entre des clones infectés et non infectés par le virus ont été rapportées sur la variété H87-4094 et ce avant l'observation de symptômes [44]. A la Réunion, des pertes de 37% (R577) et de 19% (R579) ont été enregistrées en 1^{ère} repousse [55]. Cette maladie

provoque un jaunissement de la nervure centrale des feuilles de canne à sucre (Figure 4) qui peut se répandre au reste de la feuille chez les sujets sensibles. Ce symptôme unique n'est cependant pas spécifique à la maladie. Cette dernière se répand facilement par la plantation de boutures de canne à sucre infectées par le virus.



Figure 4 : Feuilles de canne à sucre atteintes par le SCYLV

La feuille jaune de la canne à sucre est causée par un virus, le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), qui peut être transmis par des pucerons : *Melanaphis sacchari* (Zehntner), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), *Rhopalosiphum Rufiabdominalis* (Sasaki), *Sipha flava* (Forbes) et *Ceratovacuna lanigera* Zehntner.

La feuille jaune de la canne à sucre a une répartition mondiale. Le SCYLV a été détecté dans la majorité des pays producteurs (Figure 5) [42].



Figure 5: Présence du SCYLV dans les cannes à sucre du monde. Les carrés rouges désignent la présence du virus et les blancs son absence. Les nombres indiquent l'année où les tests ont été conduits. (Ewald Komor, 2010)

2.3/Le vecteur :

Le seul vecteur du SCYLV observé en Guadeloupe est le *Melanaphis sacchari* (Zehntner). Il s'agit d'un puceron de l'ordre des hémiptères et de la famille des *Aphidieae*.

Les pucerons ont un cycle de reproduction compliqué (Figure 6). Les femelles peuvent se reproduire avec ou sans mâle (parthénogénèse). Elles peuvent alors donner naissance à des nymphes ou pondre des œufs. Dans les parties chaudes du monde telles que les zones intertropicales, aucun puceron mâle n'est produit et les femelles ne pondent pas mais donnent naissance à des nymphes. Une femelle peut produire entre 20 et plus de 100 nymphes. Les jeunes pucerons (nymphes) grandissent vite et deviennent adulte en entre 7 et 10 jours et commencent alors à se reproduire. Quand les conditions sont favorables, leur nombre augmente rapidement formant ainsi une colonie sur les feuilles. Au départ, les pucerons colonisent généralement les parties tendres de la plante mais quand leur nombre devient important, ils peuvent couvrir toute la plante. En ce qui concerne la canne à sucre, le puceron *Melanaphis sacchari* n'a été observé que sur les parties basses de la plante (feuilles les plus anciennes). Au fur et à mesure que la colonie augmente ou quand les conditions environnementales sont défavorables, des pucerons ailés sont produits et vont vers de nouvelles plantes pour commencer une nouvelle colonie.

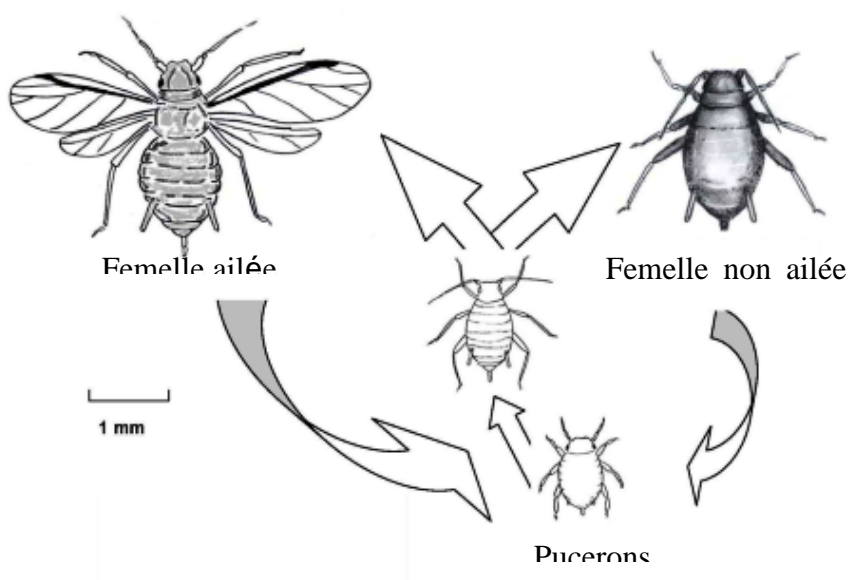


Figure 6 : Cycle de reproduction de pucerons (d'après A. M. Varela icipe)

Les adultes sont petits (1-4mm) et possèdent 2 longues antennes (Figure 7). Ils possèdent également 2 cornicules vers la partie caudale de l'abdomen. Le sinus frontal est profondément sinué avec un

tubercule frontal médian distinct. Les pucerons ailés possèdent 2 paires d'ailes. Ce puceron est de couleur crème à jaunâtre en générale. Une pigmentation plus foncée (marron, gris) apparaît chez les formes plus âgées ainsi que chez la forme ailée.

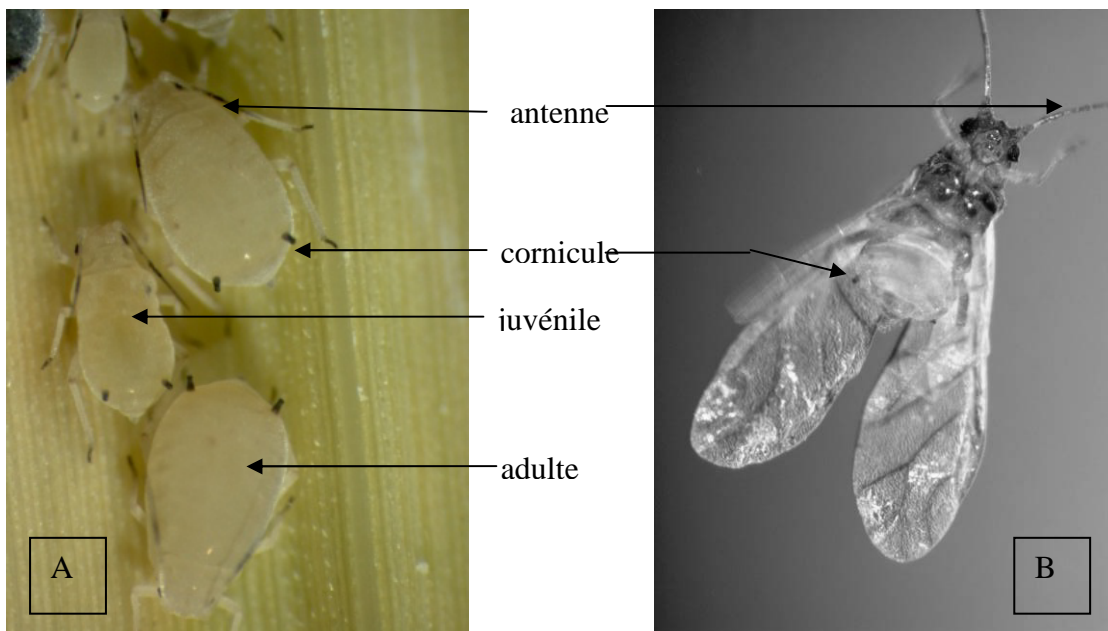


Figure 7 : Pucerons non ailés (A) et puceron ailé (B) adultes (Jean-Heinrich Daugrois)

Les pucerons sont des insectes piqueurs suceurs. Les adultes et les juvéniles se nourrissent en prélevant la sève présente dans le phloème des feuilles. Il s'agit du tissu conducteur de la sève élaborée, substance riche en glucides (saccharose, sorbitol...).

Ainsi, c'est lorsqu'un jeune puceron se nourrit sur une plante infectée par le virus qu'il acquiert le virus. Après cette prise alimentaire contaminante, le puceron n'est pas tout de suite virulent. Le virus, après ingestion, effectue un cycle à l'intérieur de l'insecte qui le fait passer du tube digestif à la cavité générale avant d'envahir les glandes salivaires d'où il sera réinjecté avec la salive à l'occasion d'un autre prélèvement de sève (Figure 8). Le virus s'accumule dans le puceron lors d'injection successive mais ne s'y multiplie pas.

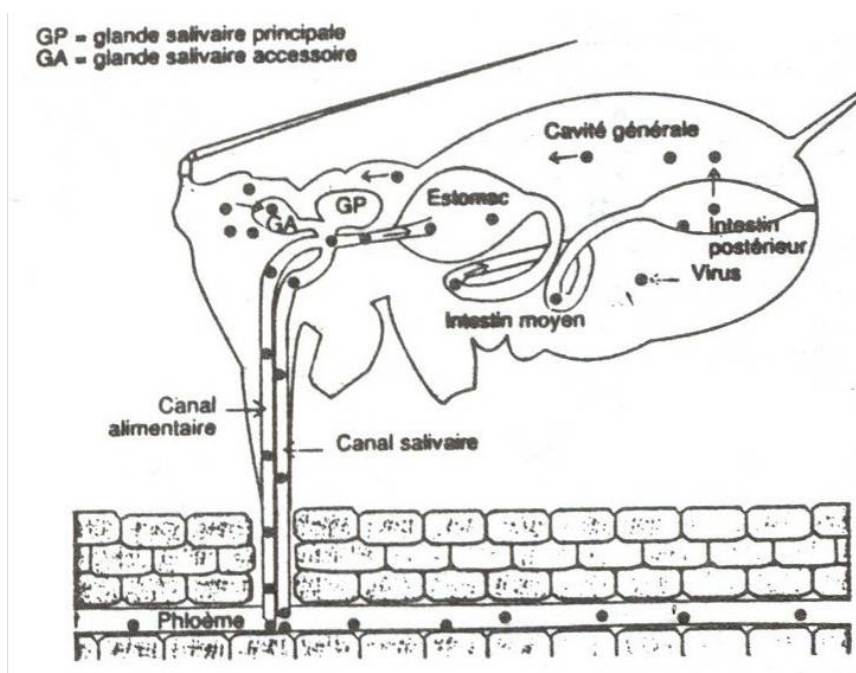


Figure 8 : Trajet du virus dans un puceron d'après Gildow 1987

Le puceron adulte contaminé ne transmet pas le virus à sa descendance. La multiplication du virus dans la plante avant que celle-ci ne puisse contaminer à son tour des pucerons sains demande 4 jours.

Les individus ailés qui quittent une plante infectée pour coloniser les jeunes plantes, déposent des larves aptères (sans ailes) et transmettent le virus aux jeunes plantes. Ce n'est qu'au bout de 7 à 10 jours que les aptères transmettent le virus : quatre jours pour que le virus se multiplie dans la plante, une journée pour que le jeune puceron acquiert le virus et deux jours pour que le virus passe du tube digestif aux glandes salivaires et soit réinjecté par le puceron dans une plante [31]. Ces résultats ont été mesurés sur l'orge et n'ont, à notre connaissance, pas encore été évalués sur la canne à sucre.

Si les pucerons ailés sont les responsables de l'introduction du virus dans la parcelle, ce sont les pucerons aptères qui en assurent la propagation entre les plantes.

C'est donc contre ces aptères que va s'orienter la lutte anti-puceron. L'activité des aptères est liée aux conditions climatiques et l'intensité des dégâts dépendra de la quantité de virus inoculé, donc de la durée de leur séjour sur la plante et dans la parcelle. Les jeunes plantes sont sensibles au virus, par contre, dans le cas de contamination tardive, les talles de la plante sont alors indépendantes et les pucerons doivent transmettre le virus à chacune d'entre elles pour que l'infection soit complète.

2.4/ Le Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV):

Le SCYLV est un virus à ARN simple brin. Il s'agit d'un *Polerovirus* de la famille des *Luteoviridae* [15]. Les *Luteoviridae* sont les phytovirus qui causent les plus grandes pertes économiques. Le génome du SCYLV est composé de 5 898 nucléotides avec une masse moléculaire d'environ 2,106 daltons [49]. Les particules virales (Figure 9) ont un diamètre de 24 à 28 nm, et sont localisées dans les cellules compagnes des vaisseaux libéro-ligneux ([59]; [63]).

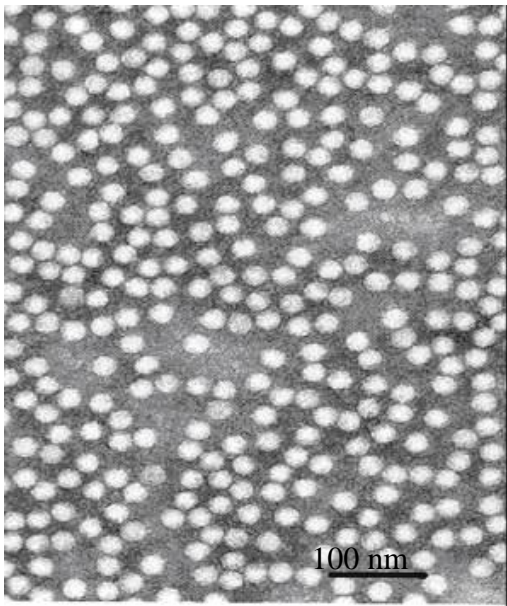


Figure 9 : Photo de particules virales du SCYLV (B.E.L Lockhart)

On ne peut se fier au jaunissement des feuilles de canne à sucre pour savoir s'il y a eu contamination. Deux méthodes de diagnostic ont donc été élaborées.

La première est la réalisation d'immuno-empreinte de feuille ou de tige de canne à sucre sur une membrane de nitrocellulose. Les particules virales sont fixées sur la membrane et révélées par immuno-réaction [59].

La répartition géographique du SCYLV a conduit plusieurs groupes de recherche à étudier sa diversité génétique. A partir de séquences tirées du génome entièrement séquencé du SCYLV, Abu Ahmad *et al.* [2] ont décrit trois génotypes (BRA, PER et REU) trouvés dans 246 échantillons de feuille provenant de 18 pays du monde entier. Le nom donné à chacun de ces génotypes est fonction de la zone géographique où ils ont été détectés pour la première fois : respectivement au Brésil, au Pérou et à la Réunion. De plus, un isolat de virus provenant de Cuba a été partiellement séquencé. Ce dernier montre seulement 77 à 80% d'analogie avec les trois autres génotypes dans la séquence peptidique de l'ORF1. Ceci suggère que l'isolat cubain est un autre génotype (génotype CUB) ou

même un isolat d'une nouvelle espèce virale [2]. Des amorces spécifiques pour Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ont été dessinées afin d'analyser la distribution des génotypes BRA, CUB, PER et REU dans les différentes régions du monde où le virus est présent. Les génotypes BRA et PER, très proches phylogénétiquement, ne peuvent être différenciés [4]. Ces deux génotypes ont par conséquent été associés et nommés génotype BRA-PER. De nouveaux génotypes viraux ont été décrits depuis : CHN1 [67], CHN2 ([66] ; [30], IND [64] et HAW [1].

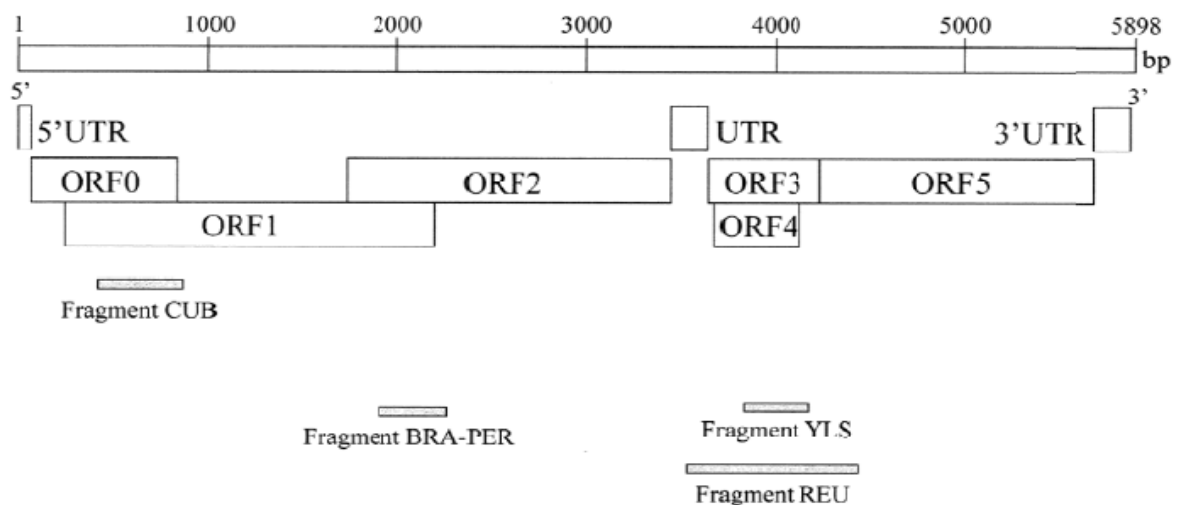


Figure 10 : Détail de la constitution du SCYLV et positions des amorces permettant sa détection (Y. Abu Ahmad 2006).

Le virus est composé de 6 cadres ouverts de lecture (Open Reading Frames) et de 3 régions non traduites (Untranslated Regions).

L'ORF0 semble lié à l'expression des symptômes viraux [62] et est un suppresseur d'interférence ARN (RNA silencing) (Mirkov unpublished results)

L'ORF1 code pour un peptide multifonction. Cette séquence peptidique inclut une sérine protéinase et une protéine virale liée au génome (VPg) (putative genome-linked viral protein).

L'ORF2 est traduit en même temps que l'ORF1 et code pour une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp).

L'ORF3 code pour une protéine capside et l'ORF4 pour une protéine de mouvement.

L'ORF5 code pour une 'read-through' protéine. Cette dernière est produite par une lecture trans du peptide codé par l'ORF3 et peut être liée à la transmission du virus par les pucerons [74].

Le fragment YLS (yellow leaf syndrom) correspond à une amorce générique qui permet de déterminer la présence du virus sans tenir compte du génotype viral. Il a une taille de 351pb et se situe partiellement sur les ORFs 3 et 4 [2]. Le fragment BRA-PER a une taille de 362pb, le fragment CUB a une taille de 450pb et le fragment REU a une taille de 905pb.

III/ Objectif et présentation de la thèse

La feuille jaune de la canne à sucre est donc une maladie d'origine virale émergente qui peut entraîner de lourdes pertes de rendements chez la canne à sucre. La lutte contre cette maladie peut se faire de différentes façons. La lutte chimique entraînant l'élimination des pucerons vecteurs du virus est possible mais néfaste pour l'environnement. Il est possible d'utiliser la lutte biologique dans le même but en créant des pièges à phéromones (technique coûteuse) ou en favorisant les espèces prédatrices locales ou introduites mais ceci peut entraîner un déséquilibre biologique qui peut s'avérer dangereux pour l'écosystème. La sélection de variétés de cannes à sucre résistantes est donc le moyen le plus efficace de lutter contre le virus. Pour cela, il faut connaître la génétique du virus ainsi que la génétique de la plante hôte. La complexité génétique des variétés de cannes à sucre modernes complique le travail des sélectionneurs. Il est donc nécessaire de connaître le mode de transmission des gènes de résistance au virus des géniteurs aux descendances et d'évaluer l'héritabilité de ce caractère.

L'étude réalisée avait pour but de définir s'il est possible de sélectionner des variétés résistantes au virus en utilisant des marqueurs moléculaires de résistance et en tenant compte de la diversité virale présente en Guadeloupe. Pour ce faire, deux expérimentations ont été menées. La première a eu pour but de déterminer la faisabilité de mettre en évidence l'existence de marqueurs moléculaire de résistance au virus. La deuxième partie a permis d'étudier 1/ l'implication de la diversité virale sur l'incidence de la maladie dans un panel variétal donné et 2/ la possibilité de transmission de la résistance au virus à partir de géniteurs déjà étudiés dans la première partie et aux descendances obtenues en tenant compte de la diversité virale présente.

PARTIE 1: ETUDE D'ASSOCIATION

PANGENOMIQUE

I/ Introduction

Le SCYLV a été identifié pour la première fois en Guadeloupe en 1996 [19] où le virus est principalement transmis par le puceron *M. sacchari*. Ce virus est présent dans les variétés commerciales de canne à sucre en Guadeloupe où l'incidence virale du SCYLV variait de 0 à 21% en 2005 [23] et a évolué depuis pour atteindre des incidences allant de 1 à 72% en 2010 (com. pers. J.H Daugrois).

L'amélioration variétale de la résistance au virus est le moyen de lutte le plus efficace pour la culture de la canne à sucre [65]. Le manque de connaissances de la résistance génétique à la feuille jaune rend la sélection de variétés résistantes à ce virus difficile. Quelques études ont traité de la variabilité génotypique de la résistance au SCYLV dans des collections de canne à sucre. L'indexation, pour le virus, de collections de variétés de cannes à sucre et d'espèces apparentées a montré qu'il existe des sources potentielles de résistance à la feuille jaune. Les variétés commerciales de cannes à sucre (*Saccharum* spp.), *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, ont présenté de fortes incidences virales contrairement à *S. barberi*, *S. spontaneum*, *Miscanthus* spp. et *Erianthus* spp qui elles ont présenté de faibles incidences virales ([13]; [41]). Malgré tout, aucune approche moléculaire de la génétique de la résistance n'a été menée jusqu'à présent.

La possibilité d'utiliser des études basées sur le déséquilibre de liaison (DL) ou la génétique d'association (association mapping) afin d'identifier des associations de marqueurs (marker-trait association) a été mise en évidence sur la canne à sucre [38]. La mesure du DL chez la canne à sucre est la conséquence de l'histoire récente de l'amélioration variétale chez cette plante. En effet, peu de générations séparent les variétés modernes de cannes à sucre issues d'un nombre limité de variétés fondatrices ancestrales, limitant ainsi le nombre de méiose et de fait, les recombinaisons chromosomiques. Une étude récente [53] a entrepris une évaluation du déséquilibre de liaison chez la canne à sucre. Des DL significatifs ont été détectés entre des marqueurs AFLP jusqu'à 40 centimorgan (cM). Bien que généralement vaste, le DL diminue brusquement quand les marqueurs sont à des distances de 5 cM ou plus. A cause de l'effet de la polyploïdie, beaucoup de cas de

marqueurs liés ne peuvent pas être reconnus. Malgré tout, le DL dans un échantillon de variétés paraît aussi efficace que l'analyse de liaison à l'intérieur d'une descendance contrôlée en termes d'assignation de marqueurs de groupes de ségrégation.

Dans plusieurs études, la génétique d'association a été appliquée à la canne à sucre. Wei et al. [68] ont utilisé 1068 marqueurs AFLP et 141 marqueurs SSR afin de détecter des associations avec la résistance à 4 maladies dans une collection de 154 variétés de canne à sucre. Wei et al. [69] ont étudié l'association entre des marqueurs DArT et le rendement ainsi qu'avec le taux de sucre dans un échantillon de 480 génotypes. Ces études confirment la possibilité de mener des études d'association pan-génomique dans le contexte de polyploidie de la canne à sucre.

L'objectif de cette étude était de trouver la méthode phénotypique la plus adéquate à l'étude de la maladie et d'utiliser une association basée sur le déséquilibre de liaison sur un panel de variétés de canne à sucre interspécifiques (*S. officinarum* x *S. spontaneum*) afin d'identifier des marqueurs moléculaires associés à la résistance à la feuille jaune.

II/ Matériel et méthode

2.1/ Matériel végétal

Un essai (A) a été planté le 28 septembre 2005 avec 189 variétés de cannes à sucre (tableau 2) provenant des principaux centres de sélection à travers le monde. Cet essai a été planté en trois blocs complets avec une parcelle élémentaire de 4 mètres linéaires. Chaque ligne a été séparée de la suivante par 1,5 mètres et chaque parcelle a été séparée de sa voisine par 1,5 mètres. Cet essai a été répété une fois. En effet un deuxième essai (B) a été planté le 26 septembre 2007. Chacun de ces deux essais a été suivi pendant 3 années c'est-à-dire en canne plantée (CP), en repousse 1 (R1) et 2 (R2). Les dates de récoltes étaient pour l'essai A, le 22 Mai 2006 (CP), le 26 Mars 2007 (R1) et le 17 Mars 2008. Concernant l'essai B, les dates de récoltes étaient : le 11 juin 2008 (CP), le 28 Mai 2009 (R1) et le 15 Mars 2010. Les deux essais ont subi une pression parasitaire différente en canne plantée. En effet, une quantité importante de pucerons vecteurs du virus (*Melanaphis sacchari*) a pu être observée en CP de l'essai A (Daugrois comm. Pers.) ce qui a entraîné l'apparition de fumagine sur les feuilles.

Tableau 2 : Liste des 189 variétés de canne à sucre étudiées ainsi que leur origine :

Variété	Origine	Variété	Origine	Variété	Origine	Variété	Origine
B41227	Barbade	BJ82118	Barbade-Jamaïque	FR90253	France (Guadeloupe)	PHIL66-07	Philippines
B53267	Barbade	BJ8510	Barbade-Jamaïque	FR90771	France (Guadeloupe)	POJ213	Java
B54001	Barbade	BR8177	Barbade-Rep. Dom.	FR91253	France (Guadeloupe)	PR1059	Porto-Rico
B54215	Barbade	BT902495	Barbade-Trinidad	FR91576	France (Guadeloupe)	PR1116	Porto-Rico
B60182	Barbade	CB47-89	Brésil	FR91699	France (Guadeloupe)	PS56	Java
B60267	Barbade	CL41-223	USA	FR9422	France (Guadeloupe)	PS58	Java
B62163	Barbade	Co281	Inde	FR94119	France (Guadeloupe)	PS60	Java
B64136	Barbade	Co290	Inde	FR941006	France (Guadeloupe)	PS61	Java
B64277	Barbade	Co312	Inde	FR9525	France (Guadeloupe)	Q100	Australie
B6623	Barbade	Co740	Inde	H32-8560	USA (Hawaii)	Q102	Australie
B70466	Barbade	Co775	Inde	H68-1158	USA (Hawaii)	Q108	Australie
B70533	Barbade	Co842	Inde	H69-9092	USA (Hawaii)	Q112	Australie
B70571	Barbade	Co997	Inde	IAC64-257	Brésil	Q119	Australie
B711001	Barbade	Co1148	Inde	JA6420	Cuba	Q122	Australie
B7410	Barbade	Co1186	Inde	L6697	Pakistan	Q127	Australie
B7460	Barbade	Co1223	Inde	LF52-3082	Fiji	Q128	Australie
B7678	Barbade	Co62175	Inde	LF53-4789	Fiji	Q134	Australie
B76359	Barbade	Co6415	Inde	LF56-26	Fiji	Q138	Australie
B77195	Barbade	Co6806	Inde	LF56-51	Fiji	Q140	Australie
B78124	Barbade	CP52-43	USA	LF61-00	Fiji	Q175	Australie
B78527	Barbade	CP57-614*	USA	LF61-05	Fiji	R331	France (Réunion)
B7945	Barbade	CP59-73	USA	LF63-33	Fiji	R366	France (Réunion)
B79136	Barbade	CP61-84	USA	LF65-3611	Fiji	R526	France (Réunion)
B82126	Barbade	CP62-258	USA	LF65-3661	Fiji	R570	France (Réunion)
B85356	Barbade	CP67-413	USA	M31/45*	Ile Maurice	R572	France (Réunion)
B85747	Barbade	CP69-1062	USA	M409/51	Ile Maurice	R573	France (Réunion)
B85764	Barbade	CP72-355	USA	M13/56	Ile Maurice	R575	France (Réunion)
B85902	Barbade	CP76-331	USA	M377/56	Ile Maurice	R576	France (Réunion)
B8649	Barbade	CP84-1198	USA	M907/61	Ile Maurice	R577	France (Réunion)
B86185	Barbade	CP85-1432	USA	M1227/62	Ile Maurice	R579	France (Réunion)
B86517	Barbade	CP86-1633	USA	M695/69	Ile Maurice	R831592	France (Réunion)
B86699	Barbade	D8804	Guyana	M292/70	Ile Maurice	R84693	France (Réunion)
B8701	Barbade	D8882	Guyana	MEX68-200	Mexico	R841269	France (Réunion)
B871296	Barbade	DB5505	Guyana	MEX71-1235	Mexico	ROC1	China
B8930	Barbade	DB60377	Guyana-Barbade	MEX73-523	Mexico	ROC3	China
B90246	Barbade	DB63237	Guyana-Barbade	MQ76/53	Australie	ROC6	China
B93440	Barbade	DB7047	Guyana-Barbade	MY51-05	Cuba	ROC7	China
B93873	Barbade	DB74208	Guyana-Barbade	MY54-129	Cuba	ROC9	China
BBZ80219	Barbade-Belize	DB8286	Guyana-Barbade	N11	Afrique du Sud	S17	Saipan
BBZ8108	Barbade-Belize	DB82113	Guyana-Barbade	N14	Afrique du Sud	SP71-8210	Brésil
BBZ85102	Barbade-Belize	DB86124	Guyana-Barbade	N15	Afrique du Sud	SP73-3108	Brésil
BJ6902	Barbade-Jamaïque	F148	Taiwan	N17	Afrique du Sud	SP78-3137	Brésil
BJ7003	Barbade-Jamaïque	F156	Taiwan	N19	Afrique du Sud	SP79-1011*	Brésil
BJ7013	Barbade-Jamaïque	F160	Taiwan	N22	Afrique du Sud	SP80-1842	Brésil
BJ7938	Barbade-Jamaïque	F175	Taiwan	N52-219	Afrique du Sud	TUC74-06	Argentina
BJ8226	Barbade-Jamaïque	FR8903	France (Guadeloupe)	N53-216	Afrique du Sud	WI8934	Barbade
BJ8231	Barbade-Jamaïque	FR9027	France (Guadeloupe)	NC0334	Inde		
BJ8248	Barbade-Jamaïque	FR90219	France (Guadeloupe)				

- *non utilisée dans les études d'association pan-génomique

En ce qui concerne la CP de l'essai 2 et les repousses 1 et 2 des deux essais, peu de pucerons ont été observés.

2.2/ Echantillonnage

Pour les deux essais, les feuilles ont été prélevées sur 10 à 15 tiges de canne à sucre choisies aléatoirement, le long de la parcelle élémentaire, en CP et en R2 pour chaque parcelle après cinq mois de culture.

Les feuilles prélevées correspondent à la 1^{ère} feuille à ochrea visible (Figure 11).

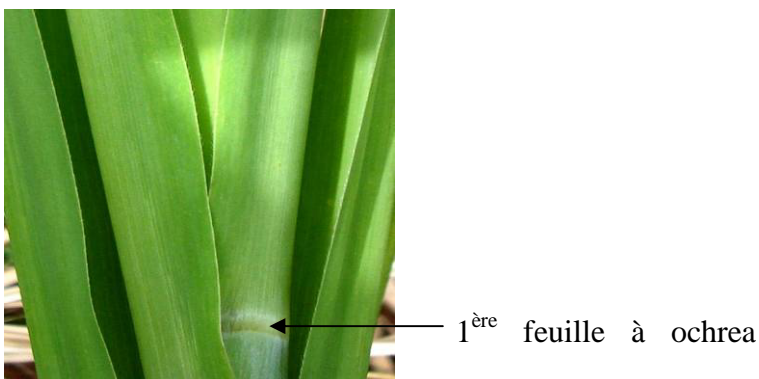


Figure 11: Feuille prélevée

Les tiges de cannes à sucre ont également été échantillonnées juste avant la coupe en canne plantée et en repousse 2. En effet 6 tiges ont été prélevées par parcelle en CP de l'essai A et 10 par parcelle pour l'essai B et R2 de l'essai A. Un entre nœud du tiers inférieur de chaque canne à sucre échantillonné a été sélectionné. Un cylindre central de 1 centimètre de diamètre et d'environ 5 cm de long a été prélevé de chacun de ces entre nœuds, technique déjà utilisée pour diagnostiquer une autre maladie de la canne à sucre, le rabougrissement des repousses [21]. Les échantillons ont été conservés à -20°C en attendant d'effectuer les diagnostics viraux.

2.3/ Diagnostique viral par immuno-empreinte de feuilles et de tiges (TBIA)

Nous avons utilisé la technique décrite par Schenk [59] et modifiée par Daugrois [20].

Protocole utilisé :

Une section transversale de la partie centrale du bas de feuilles échantillonnées et une section transversale des échantillons de tiges ont été imprimées sur des membranes de nirtocellulose (Millipore, Protran BA85, 0,45 µm). Les particules virales présentes sur les empreintes sont ensuite bloquées pendant 30 minutes sous agitation avec de l'albumine bovine dissoute à 3% dans du tampon TBS. Les membranes sont ensuite mises pendant 90 minutes dans une solution de TBS-BSA à 1% contenant du Tween à 0,05% et un sérum de lapin anti-SCYLV (dilution à 1/10000) mis à notre disposition par le Professeur B.E.L. Lokhart. Trois rinçages de 5 minutes chacun dans une solution de TBS-Tween sont ensuite nécessaires afin d'éliminer l'excès d'anticorps. Les membranes sont mises ensuite pendant 90 minutes dans une solution de TBS-BSA à 1% et un sérum de conjugué phosphatase alcaline de chèvre anti IgG de lapin (dilution à 1/10000). Après trois rinçages successifs dans du TBS-Tween, les membranes sont mises dans une solution de 5bromo-4chloro-3indoliphosphate (BCIP)/ NitroBlue Tetrazolium (NTB) (un comprimé de Fast Blue T. tablets Sigma pour 20 à 30 ml d'eau distillée) pendant environ 20 minutes. L'arrêt de la réaction de coloration se fait en plongeant les membranes dans de l'eau distillée. Les membranes sont mises à sécher ce qui permet la fixation de la coloration. La lecture des membranes se fait ensuite en les humidifiant avec de l'eau distillée et en les observant à la loupe binoculaire. Les empreintes positives sont colorées en bleu (Figure 12).

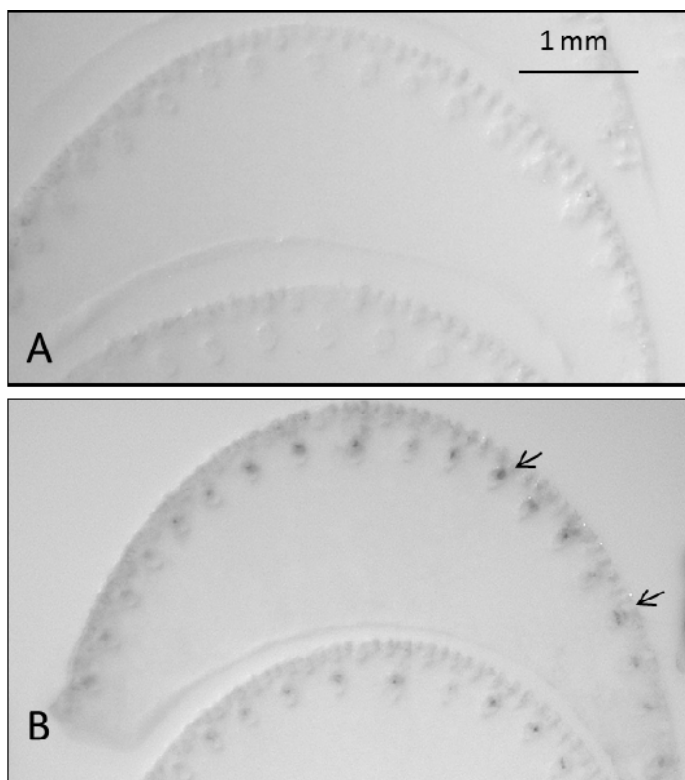


Figure 12 : Immuno-empreintes de parties centrales de feuilles de canne à sucre. A : feuilles négatives B : feuilles positives ; les particules virales sont colorées en bleu (photos : C. Edon)

2.4/ Données recueillies

Pour chaque parcelle, le pourcentage de feuilles et de tiges positives (incidence virale) ont été calculées. Nous avons également estimé la densité du virus en calculant pour chaque parcelle, la moyenne de l'intensité des infections virales observées dans les immuno-empreintes de feuilles et de tiges. La densité de l'infection a été évaluée avec une échelle allant de 0 à 5. Concernant les immuno empreintes de feuilles, l'échelle était la suivante : 0 correspondait à aucun vaisseau vasculaire infecté, 1 à 1 à 3 vaisseaux infectés, 2 à 10 à < 50% d'infection, 3 à 50 à <100% d'infection, 4 à 100% d'infection avec une coloration peu intense et 5 à 100% d'infection avec une coloration des vaisseaux vasculaires intenses. Pour les immuno-empreintes de tiges, l'échelle utilisée pour les feuilles a été modifiée comme suit : 2 correspondait à 5 à <30% de vaisseaux vasculaires infectés, 3 à 30 à <60% d'infection, 4 à 60 à <100% d'infection et enfin 5 correspondait à 100% de vaisseaux vasculaires infectés.

2.5/ Analyses statistiques des données

Toutes les analyses statistiques ont été menées avec le logiciel SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Les données d'incidences virales ont tout d'abord été transformées avec la fonction $\arcsin(\sqrt{\text{incidence virale}})$. L'indépendance entre les moyennes et les variances ainsi que la distribution des résidus ont été vérifiées.

La procédure GLM (modèle général linéaire) du logiciel a été utilisée afin de déterminer les effets variétés et les interactions avec les autres variables (cycle de culture et essai). Pour cette procédure, nous avons défini le cycle de culture ainsi que l'essai comme des mesures répétées.

La procédure MIXED (modèle mixte) de SAS a permis de déterminer les variances utilisées pour calculer l'héritabilité au sens large. Nous avons également pu déterminer les valeurs prédites pour chaque variété, BLUPs (meilleure prédiction linéaire non biaisée), pour chaque essai avec cycle et bloc(cycle) comme effets fixes et variétés, variétés*cycles comme effets aléatoires. Nous avons également défini la parcelle comme une mesure répétée. Pour chaque variété dans chaque essai, les BLUPs ont été déterminées en additionnant à la valeur estimée pour la variété, l'intercept et la valeur estimée des effets fixes [cycle et bloc(cycle)]. Ce sont ces données de BLUPs qui ont été utilisées par la suite pour les études de corrélations entre les différents types de données et les études de marquage moléculaire.

2.6/ L'héritabilité au sens large (H^2)

L'héritabilité au sens large (H^2) correspond au degré avec lequel la variation phénotypique est due aux facteurs génétiques [40]. Elle reflète donc toutes les contributions génétiques à la variance phénotypique d'une population.

$$H^2 = \frac{Var(G)}{Var(P)}$$

La variance génétique [Var(G)] est la variance des écarts à la moyenne dus aux différences génétiques dans la population étudiée. La variance phénotypique [Var(P)], elle, correspond à la variance des mesures d'un caractère phénotypique sur la population. Cette héritabilité correspond donc à la fraction héréditaire de la variation totale mesurée.

Pour notre expérimentation, le modèle suivant a été utilisé :

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + (\sigma_i^2 / 2) + (\sigma_e^2 / 6)}$$

Où σ_G^2 correspond à la variance génétique (variété), σ_i^2 à l'interaction entre variété et cycle de culture et σ_e^2 à la résiduelle du modèle.

2.7/ Etudes d'associations

Des marqueurs AFLP ou polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (Amplification Fragment Length Polymorphism) ont été générés en utilisant le AFLP® Analysis System I (Invitrogen) avec 59 paires d'amorces. Le protocole recommandé par le fabricant a été suivi en tenant compte de quelques modifications décrites par Hoarau et al. (2001). La Diversity Arrays Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australia) a produit les marqueurs DArT (Diversity Arrays Thechnology) en utilisant leurs puces de canne à sucre commerciales [36]. Au total, 4189 marqueurs AFLP et DArT ont pu être utilisés dans cette étude.

Les associations phénotypes avec les marqueurs ont été calculées pour chaque essai à partir des BLUPs. Les tests d'association des marqueurs ont été réalisés avec le logiciel TASSEL version 3.0. Deux modèles ont été utilisés : le modèle général linéaire (GLM) avec une matrice Q de structure de la population et la méthode Q+K (K : coefficient d'apparentement entre individus ou kinship) basée sur le modèle mixed linéaire (MLM) compressé proposé par Zangh et al., [71].

La structure génétique de la population (matrice Q) a été déduite des marqueurs DArT avec une analyse en composante principale (ACP) conduite avec la procédure Princomp du logiciel SAS. Les axes de l'ACP ont été estimés avec les marqueurs DArT en suivant les restrictions suivantes : les marqueurs avec plus de 10% de données manquantes parmi les variétés et les variétés avec plus de 10% de données manquantes parmi les marqueurs ont été supprimés. Les marqueurs dont les fréquences étaient en dehors de l'intervalle [0,05-0,95] ont également été supprimés. Ceci nous a permis d'obtenir un ensemble de 187 variétés caractérisées par 1509 marqueurs donnant 24 axes significatif au seuil de Tracy-Widom. Le nombre d'axes utilisés pour définir la matrice Q pour les modèles MLM et GLM ont été déterminés comme décrits par Zhu and Yu [73]. Les valeurs phénotypiques (BLUPs) des variétés ont été associées à un nombre croissant d'axes. Nous avons choisi les premiers axes significatifs présentant un BIC (Bayesian Information Criteria) minimum. Pour les deux modèles utilisés, la matrice Q a été considérée comme une covariable fixe. En ce qui

concerne le modèle GLM, 1000 permutations ont été effectuées afin d'obtenir une erreur de type I (GWER) pour ce modèle.

Pour le modèle MLM, en plus de la matrice de structure (Q) utilisée pour le modèle GLM, nous avons utilisé une matrice de kinship (K). La matrice K correspond à une matrice de double similarité de Jaccart définie avec le logiciel Darwin [51]. Cette dernière a été estimée en utilisant les mêmes données que pour la matrice Q.

Les haplotypes ont été construits en testant les associations de marqueurs par paire avec un test bilatéral de Fisher. Nous avons ensuite groupé toutes les associations significatives des marqueurs par transitivité [53]. Nous avons considéré que les marqueurs étaient associés à partir d'une erreur de type I du seuil de Bonferroni ($P < 5,7 \cdot 10^{-9}$). Nous avons alors trouvé 460 haplotypes et 1637 marqueurs alléliques individuels.

Pour le modèle GLM, après 1000 permutations, le seuil de signification des marqueurs a été fixé à un seuil de 0,2. En ce qui concerne le modèle MLM, le seuil fixé a été celui de l'erreur de type I de Bonferroni de $(-\log P)$ avec $P = 0,05/2097$ ce qui correspond à un $-\log P$ de 4,62.

L'utilisation de modèles appropriés pour la structure de la population pour une erreur de type I a été contrôlée avec les répartitions des valeurs de P [71]. Des graphiques ont été réalisés en distribuant les valeurs de P observées sur les valeurs de P cumulées pour toutes les données des modèles GLM et MLM. La distance entre les valeurs de P observées et la diagonale des valeurs attendues ont été illustrées en calculant le rapport de valeurs de P observées $(-\log P)$ sur la distribution cumulée attendue $(-\log P \text{ attendu})$ pour la valeur de P correspondant au marqueur médian.

Afin de modéliser l'effet des marqueurs moléculaires avec l'effet de la structure sur les données phénotypiques de chaque essai, une régression linéaire multiple a été effectuée en utilisant l'option stepwise de la procédure REG du logiciel SAS.

2.8/ Recherche de gènes impliqués dans la résistance aux maladies

Le séquençage du génome de la canne à sucre est à peine commencé mais il existe une synténie et une colinéarité entre certains groupes de liaison de canne à sucre et le sorgho [22]. Afin de découvrir de potentiels gènes marqués, les marqueurs DArTs significatifs dont les séquences nucléotidiques étaient connues ont été alignées au génome du sorgho (*Sorghum bicolor*) en utilisant

le programme blastP [6]. Les gènes exprimés autour de la séquence comparée ont été analysés avec une distance de 100kb autour du marqueur. En effet, il existe un déséquilibre de liaison chez *Sorghum bicolor* allant jusqu'à 100kb [34]. L'analyse s'est faite avec la base de données Orygenes (orygenesdb.CIRAD.fr). Les fonctions des gènes ont été ensuite vérifiées par homologie avec *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org). L'existence de régulation des gènes homologues chez *Arabidopsis thaliana* par des stimuli liés aux défenses de la plante a été cherchée sur le site de pathoplant (www.pathoplant.de).

III/ Résultats

3.1/ Analyse phénotypique

Les moyennes de chaque cycle de culture de chaque essai ont été calculées avec le modèle GLM du logiciel SAS (Figure 13).

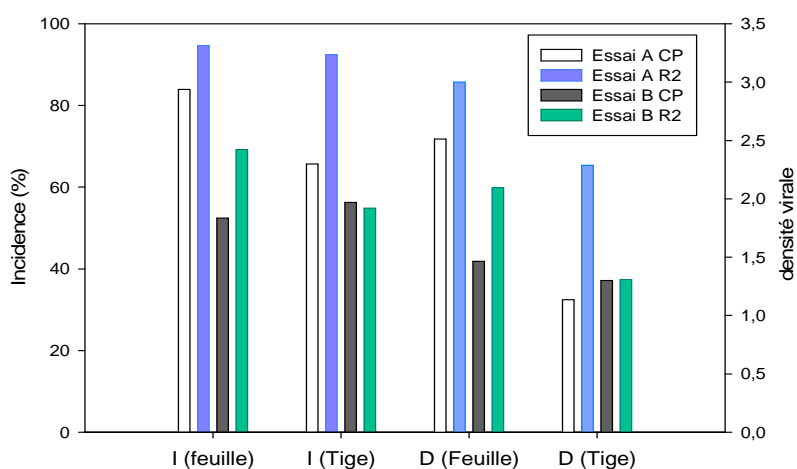


Figure 13: Moyennes prédites en canne plantée (CP) et en seconde repousse (R2) pour les deux types d'échantillonnage de chaque essai et pour l'incidence (I) et la densité du virus (D)

L'incidence et la densité virale dans les feuilles étaient plus importantes dans l'essai A que dans l'essai B pour chaque cycle de culture. Pour chaque essai, il y a une augmentation de l'infection (incidence et densité virale) entre la canne plantée et la repousse 2 dans les échantillons de feuille. L'augmentation de l'infection des tiges entre les cycles de culture n'a été observée que pour l'essai A.

Les effets variété, essai et cycle de culture étaient significatifs ($P < 0,0001$) de même que les interactions variété x essai, variété x cycle de culture et variété x cycle de culture x essai.

L'interaction essai x cycle de culture n'était pas significative pour l'incidence du virus dans les feuilles contrairement à celle correspondant aux autres données phénotypiques (Tableau 3). Par contre pour un même degré de liberté, les valeurs de la statistique de Fisher (F) de l'effet variété étaient 4 à 8 fois plus importantes que pour l'interaction variété x essai et 10 à 15 fois plus importante que les valeurs F de l'interaction variété cycle de culture. Les deux essais ont subi des pressions parasitaires différentes et les données montrent qu'il existe un fort effet essai et une interaction essai x variété significative. De ce fait, les essais A et B ont été traités séparément pour les études d'associations.

Tableau 3: Effets variété, essai, cycle de culture et interactions déterminés avec la procédure GLM avec le cycle de culture et l'essai comme mesures répétées. Les analyses ont été effectuées avec les données d'incidence et de densité virales sur les échantillons de feuilles et de tiges

	Échantillons de feuilles				Echantillons de tiges			
	Densité virale		Incidence virale		Densité virale		Incidence virale	
	ddl	F	ddl	F	ddl	F	ddl	F
Variété	188	29,06 ^a	188	30,71 ^a	185	16,86 ^a	185	17,5 ^a
Essai	1	837,6 ^a	1	865,57 ^a	1	180,93 ^a	1	297,62 ^a
Essai*variété	188	3,77 ^a	188	5,22 ^a	185	3,58 ^a	185	3,93 ^a
Cycle de culture	1	513,09 ^a	1	425,09 ^a	1	511,44 ^a	1	159,22 ^a
variété*cycle de culture	188	2,17 ^a	188	2,03 ^a	185	1,68 ^a	185	1,34 ^a
Essai*cycle de culture	1	7,90 ^b	1	0,08 ^c	1	576,00 ^a	1	209,45 ^a
Essai*cycle de culture*variété	188	1,75 ^a	188	1,71 ^a	185	1,6 ^a	185	1,44 ^a

Les lettres suivant les valeurs de F correspondent à la probabilité qu'il n'y ait pas d'effets pour les variables testées: ^a $P < 0,0001$; ^b $P < 0,01$; ^c $P > 0,05$

Les héritabilités au sens large (H^2) ont été calculées à partir des analyses de données avec la procédure MIXED de SAS pour chaque type de donnée des deux essais. En ce qui concerne l'essai A, l'héritabilité était de 0,91, 0,89, 0,83 et 0,80 respectivement pour l'incidence et la densité virale dans les feuilles et dans les tiges. De la même façon nous obtenons des héritabilités pour l'essai B de 0,95, 0,86, 0,92, et 0,85 respectivement pour l'incidence et la densité virale dans les feuilles et dans les tiges. Pour les deux essais, les mesures d'incidence calculées à partir des feuilles donnent

les meilleures valeurs d'héritabilité. Les valeurs d'héritabilité obtenues indiquent une bonne contribution génétique à la variance phénotypique de la population dans chaque essai.

Les différentes données de phénotypage (BLUPs) calculées pour chaque variété dans chaque essai ont été comparées avec une régression linéaire dans et entre les essais. Toutes les régressions calculées étaient significatives ($P < 0,0001$) et les coefficients de détermination (r^2) variaient de 0,49 à 0,91 pour les régressions faites dans chaque essai et de 0,33 à 0,57 pour les régressions effectuées entre chaque essai (Tableau 4). La comparaison entre les deux essais montre qu'il existe une bonne corrélation entre l'incidence et la densité virale mesurée sur les feuilles ($r=0,70$ et $0,75$ respectivement). Par contre la corrélation entre incidence et la densité virale des tiges étaient plus faibles avec des valeurs respectives de 0,57 et 0,64.

Tableau 4 : Coefficients de détermination (r^2) à l'intérieur et entre les essais A et B déterminés avec les valeurs de BLUPs des variétés de chaque essai. Les corrélations des données à l'intérieur des essais sont au dessus de la diagonale et les corrélations entre essais sont sous la diagonale

			Essai A				Essai B			
			Incidence virale		Densité virale		Incidence virale		Densité virale	
			Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
Essai A	Incidence virale	Feuilles	1	0,76	0,85	0,53				
		Tiges		1	0,69	0,83				
	Densité virale	Feuilles			1	0,58				
		Tiges				1				
Essai B	Incidence virale	Feuilles	0,49				1	0,91	0,92	0,79
		Tiges		0,33				1	0,85	0,89
	Densité virale	Feuilles			0,57				1	0,81
		Tiges				0,41				1

3.2/ Génétique d'association

Pour toutes les données, les trois 1ers axes de l'ACP (Analyse en composantes principales) ont été sélectionnés en utilisant le critère du BIC minimum afin de créer la matrice Q utilisée dans les modèles MLM compressé et GLM. La valeur du rapport du $-\log P$ observé sur $-\log P$ attendu pour le marqueur médian est comprise entre 1,06 et 1,13 pour le modèle GLM et entre 1,01 et 1,08 pour le modèle MLM compressé. Ces 4 valeurs extrêmes ont été illustrées en 2 graphiques PP et l'alignement avec la diagonale suggère un contrôle de l'erreur de type I approprié (Figure 14a et 14b).

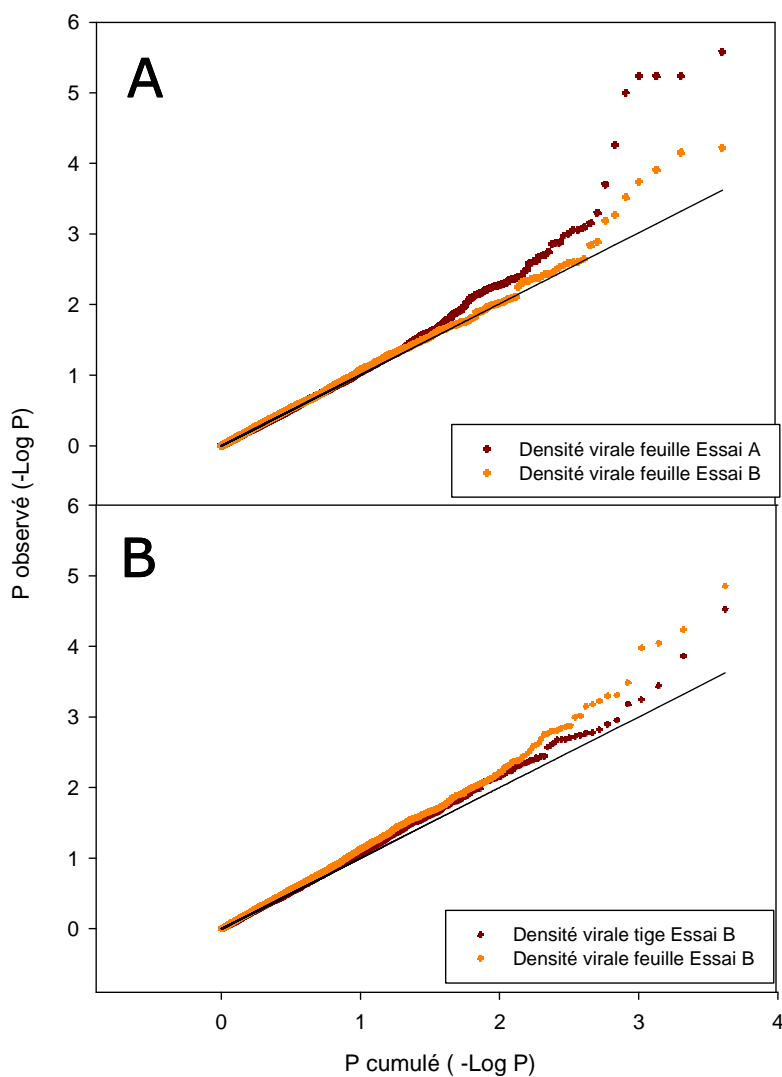


Figure 14: Distributions des valeurs de P des 2 valeurs extrêmes du ratio médian pour les graphiques PP effectuées pour les modèles MLM (A) et GLM (B). Les distributions des valeurs de P sont effectuées en réalisant le graphique des valeurs de P observées sur les valeurs de P attendues cumulées (en suivant une échelle de $-\log_{10}$). Une distribution uniforme est indiquée par la diagonale attendue.

Nous avons conservé les marqueurs significatifs dans au moins un jeu de données avec le modèle GLM ou le modèle MLM compressé. Parmi huit marqueurs, 5 sont des DArTs détectés avec les modèles GLM et MLM et les 3 autres (marqueurs AFLP) ont été détectés uniquement avec le modèle GLM (Tableau 5). Trois des 5 marqueurs DArT détectés appartiennent au même haplotype. Nous avons donc finalement obtenu 6 marqueurs : 1 haplotype et 5 marqueurs indépendants.

Tableau 5: Associations de marqueurs déterminées avec les modèle GLM (matrice Q) et le modèle MLM compressé (matrice Q+K) pour l'incidence et la densité virale dans les échantillons de feuilles et de tiges pour les essais A et B

Marqueurs				acacta12	agccag14	agccta51	B424681	Ha 484 ^b	B424752	
Essai A	Proportions du marqueur ^a				0,19	0,17	0,11	0,20	0,08	0,14
	incidence SCYLV	Feuilles	MLM	-log <i>P</i>	3,97	4,30	0,84	4,43	6,33^c	4,55
				r ²	0,09	0,09	0,01	0,09	0,14	0,10
			GLM	GWER	0,06^c	0,06^c	1,00	0,05^c	0,20^c	0,21
			Tiges	MLM	-log <i>P</i>	2,11	2,39	0,77	3,09	4,83^c
				r ²	0,04	0,05	0,01	0,06	0,11	0,06
		densité SCYLV	Feuilles	GLM	GWER	0,90	0,90	1,00	0,79	0,36
	MLM			-log <i>P</i>	3,70	4,26	1,14	5,00^c	5,24^c	5,58^c
				r ²	0,09	0,09	0,02	0,11	0,11	0,12
			Tiges	GLM	GWER	0,05^c	0,04^c	1,00	0,09^c	0,25
				MLM	-log <i>P</i>	1,79	2,70	0,31	3,14	4,06
				r ²	0,04	0,05	0,00	0,07	0,09	0,06
		GLM	GWER	0,99	0,23	1,00	1,00	0,30	0,98	
Proportions du marqueur ^a					0,19	0,17	0,11	0,20	0,08	0,14
Essai B	incidence SCYLV	Feuilles	MLM	-log <i>P</i>	1,82	3,46	4,15	4,70^c	1,04	2,49
				r ²	0,03	0,06	0,07	0,10	0,04	0,05
			GLM	GWER	1,00	0,41	0,08^c	0,01^c	1,00	1,00
			Tiges	MLM	-log <i>P</i>	1,69	4,03	3,45	4,89^c	2,14
				r ²	0,03	0,08	0,07	0,14	0,04	0,04
			GLM	GWER	1,00	0,16^c	0,33	0,01^c	1,00	1,00
	densité SCYLV	Feuilles	MLM	-log <i>P</i>	2,01	2,88	3,74	4,15	0,93	2,59
				r ²	0,04	0,05	0,08	0,09	0,01	0,05
			GLM	GWER	1,00	0,86	0,16^c	0,04^c	1,00	1,00
			Tiges	MLM	-log <i>P</i>	1,38	3,60	3,01	4,16	1,93
				r ²	0,02	0,07	0,06	0,09	0,03	0,03
				GLM	GWER	1,00	0,38	0,84	0,11^c	1,00

^a Marqueur présent/total des variétés testées.

^b Haplotype représentant les marqueurs B424690, B425799, B427216.

^c Marqueurs significatifs pour l'association phénotypique (GWER) à un seuil de 0,2 (1000 permutations) pour GLM et -Log *P* en dessous de 4,62 (seuil de Bonferroni) pour MLM.

Cinq marqueurs ont été trouvés dans l'essai A : acacta12, agccag14, B424681, l'haplotype H484 (B424690, B425799, B427216) et B424752 et trois ont été détectés dans l'essai B : agccag14, agccta51 and B424681. Deux de ces marqueurs (agccag14 and B424681) sont communs aux essais A et B. Les marqueurs significatifs ont un r² allant de 0,07 à 0,14. Deux marqueurs (acacta12 and B424752), spécifiques de l'essai A, étaient significatifs uniquement pour les données concernant les feuilles. Malgré tout, dans ce cas, les données concernant les tiges étaient presque significatives (Tableau 5). De la même manière, un marqueur (agccta51) spécifique de l'essai B était lié aux échantillons de feuilles. Tous les marqueurs significatifs étaient liés à une diminution des valeurs phénotypiques et les fréquences des marqueurs étaient à un faible taux.

Les effets cumulés des 6 marqueurs significatifs sur la variation phénotypique ont été calculés avec une régression linéaire multiple (stepwise multiple regression linear model). Cette régression s'est faite avec les 162 variétés sans données alléliques manquantes pour les marqueurs sélectionnés (Tableau 6). La part de la variation expliquée par les marqueurs dans la régression multiple variait de 0,17 à 0,32 pour l'essai A et de 0,19 à 0,25 pour l'essai B. Un marqueur (B424681) a été conservé par le modèle de régression multiple pour toutes les données phénotypiques. Ce marqueur est aussi le plus fréquent dans les analyses d'associations pan-génomiques (Genome wide associations). Les marqueurs *acacta12*, *agccat51* et B424752 détectés uniquement dans 1 des 2 essais par l'étude d'association (GWAs) ont été retenus au moins 1 fois dans l'essai dans lequel ils n'ont pas été détectés par l'étude d'association (GWAs). D'un autre côté, un marqueur détecté seulement dans l'essai A, H484 reste spécifique à ce dernier dans la régression linéaire multiple. La modélisation de la résistance au SCYLIV réalisée en tenant compte de la structure de la population et des marqueurs donne de meilleurs résultats avec les échantillons de feuilles.

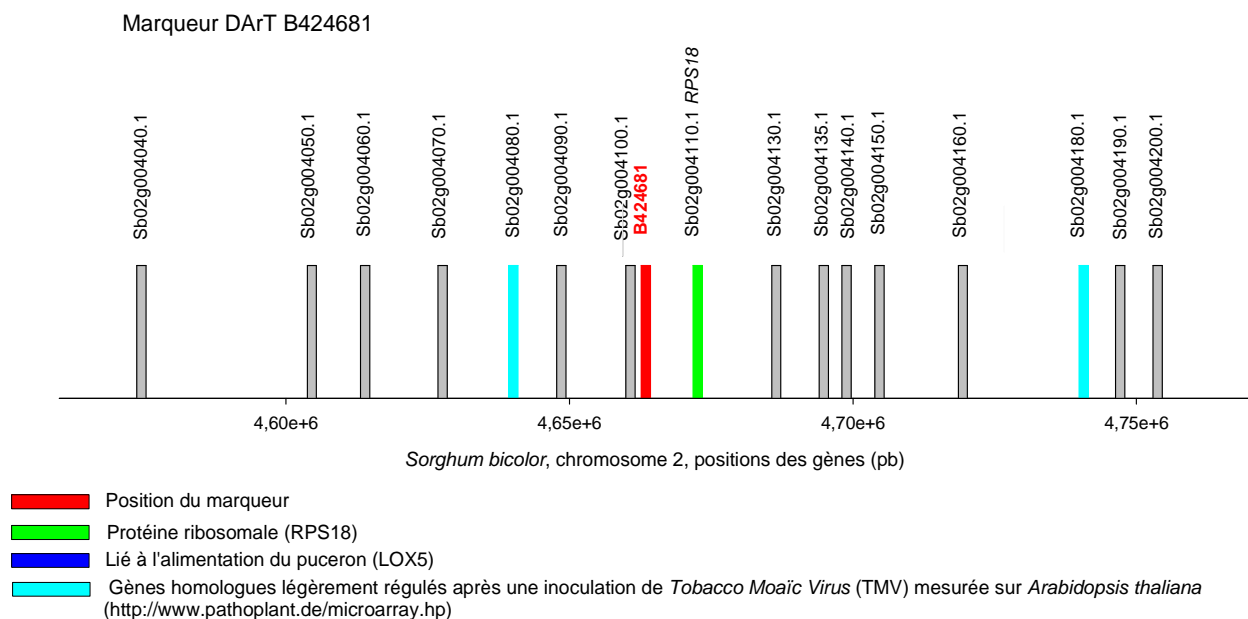
Tableau 6: Résultats des analyses de régression multiples (modèle stepwise) des marqueurs et de la structure de la population sur l'infection virale, caractérisée par l'incidence et la densité virale sur les échantillons de feuilles et de tiges dans les essais A et B. r^2 représente la variation phénotypique expliquée par le modèle (structure + marqueurs). Entre parenthèses est notée la part des marqueurs dans la variation expliquée. Les marqueurs conservés par le modèle sont marqués d'une croix (X). Les analyses de régression multiples ont été menées avec 162 variétés sans données manquantes pour les marqueurs spécifiés dans le modèle.

Essai	Partie de la plante	phénotype	r^2 (marqueur)	<i>acacta12</i>	<i>agccag14</i>	<i>agccta51</i>	B424681	B424752	H484
A	Feuille	Incidence	0,39 (0,32)	X		X	X	X	X*
A	Feuille	Densité	0,4 (0,32)	X*		X	X	X	X
A	Tige	Incidence	0,27 (0,20)	X			X	X	X*
A	Tige	Densité	0,23 (0,17)	X			X	X	X*
B	Feuille	Incidence	0,32 (0,25)		X	X	X*	X	
B	Feuille	Densité	0,29 (0,23)	X		X	X*	X	
B	Tige	Incidence	0,28 (0,23)		X	X	X*		
B	Tige	Densité	0,24 (0,19)		X	X	X*		

*Marqueur le plus significatif dans les analyses de régression multiples

Les marqueurs DArTs significatifs ont été blastés sur le *Sorghum bicolor*. Les 3 marqueurs B424690, B425799, B427216 appartenant au même haplotype (H484), ont montré le même alignement de séquence de leurs 526 nucléotides sur le chromosome 8 du *S. bicolor* avec un score HSP entre 815 et 852 et environ 95% de nucléotides identiques. Les 569nt constituant le marqueur B424681 ont montré 92% d'homologie de séquence avec une séquence de 569nt du chromosome 2 avec un HSP score de 775. Le marqueur B424752 dont la séquence est constituée de 540nt n'a montré aucun alignement de séquence total mais uniquement partiel avec de multiples sites de

différents chromosomes de *S. bicolor*. La séquence du marqueur DArT B424752 contient une partie de la séquence d'un rétrotransposon sans longues régions terminales répétées (non long terminal repeat (LTR) rétrotransposon long interspersed nuclear elements (LINEs)). Ce rétrotransposon peut être présent en grand nombre de copies chez les plantes. Nous avons cherché les correspondances associées aux fonctions des gènes sur une distance de 100kb autour des séquences de l'haplotype H484 et du marqueur DArT B424681. Pour ces 2 marqueurs, nous avons trouvé des gènes homologues qui, à un faible taux, sont régulés par l'infection par le *Tobacco mosaic virus* (TMV) chez *Arabidopsis thaliana*. Un gène codant pour une protéine ribosomale 40S a été trouvé près de la séquence du marqueur B424681. Un gène homologue à un gène intervenant dans l'alimentation d'un puceron a été trouvé près de la séquence de l'haplotype H484 (Figure 15).



Haplotype H484 (constitué des marqueurs DArT B424690, B425799 et B427216)

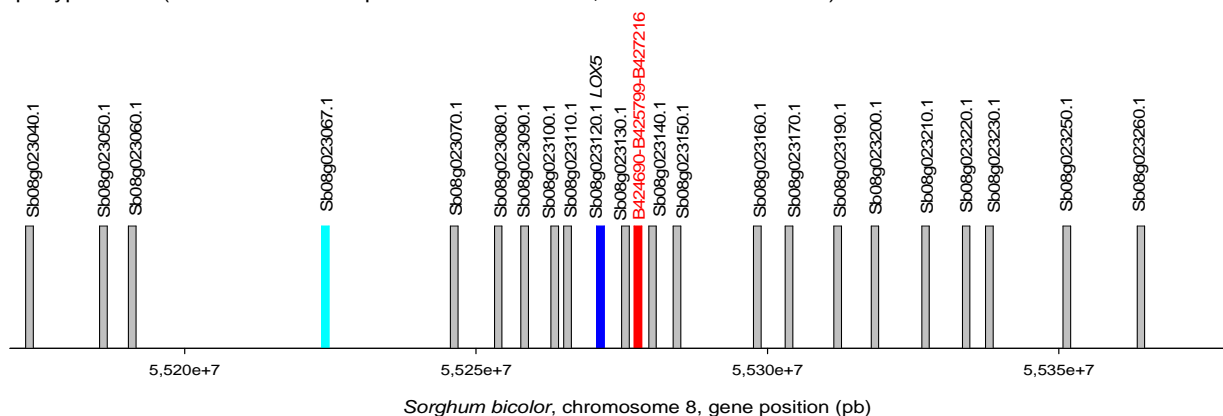


Figure 15: Marqueurs DArTs alignés au génome du *Sorghum bicolor* et les gènes les entourant sur une distance de 100kb. Les gènes potentiellement liés à l'infection par le SCYLV de la canne à sucre sont en couleur.

IV/ Discussion

Cette étude d'association avait pour but de rechercher de possibles résistances génétiques au SCYLV chez la canne à sucre. Pour ce faire, nous avons sélectionné 189 variétés de canne à sucre issues de différents centres de sélection d'origine mondiale. Les données d'incidence et de densité virale ont été recueillies dans deux essais distincts sur des échantillons de feuilles et de tiges. La densité et l'incidence virale mesurées dépendent non seulement des infections par le vecteur après la plantation mais aussi de la contamination des boutures plantées. Dans notre étude, un effet significatif a été mesuré entre les essais malgré le fait que les cannes à sucre plantées proviennent de la même origine. Nous avons également constaté la présence d'un nombre important de pucerons vecteurs du virus uniquement en canne plantée de l'essai A. De ce fait, nous avons conclu que l'effet essai mesuré provenait essentiellement de la différence entre la quantité de pucerons présents entre les 2 essais. De plus, l'interaction essai x variété peut provenir de la différence entre les réponses des plantes à une pression parasitaire élevée. Cette différence peut provenir de la variation de la résistance de la plante au vecteur, sachant que la résistance au vecteur existe chez la canne à sucre [25], ou alors d'une variation de la réponse de la plante en fonction de la densité de population du vecteur.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les incidences virales mesurées à partir d'échantillons de feuilles sont plus importantes que celles mesurées à partir d'échantillons de tiges. Le fait d'échantillonner une partie de la tige (section transversale de 1cm de diamètre) peut conduire à sous estimer l'infection de celle-ci. Il est possible également que le virus ait plus d'affinité à se multiplier dans la feuille et prend du temps pour circuler dans la plante en supposant que l'infection commence dans la feuille et apparaîtra dans un second temps dans la tige. Cette dernière possibilité est la plus probable car on note une augmentation de l'infection virale dans les tiges en repousse 2 de l'essai A pour lequel les pucerons étaient plus nombreux en CP. Malgré les différences observées entre les données des feuilles et celles des tiges, les effets variétés mesurés sur ces deux types d'échantillons sont comparables. De plus, les héritabilités au sens large obtenues pour les deux essais sont comprises entre 0,80 et 0,95 pour toutes les données phénotypiques. Ces valeurs élevées d'héritabilité confirment la possibilité de trouver des marqueurs moléculaires liés à la résistance de la plante à l'infection du SCYLV. Cette recherche de marqueurs s'est faite par une étude d'association pangénomique avec 2 modèles (GLM et MLM compressé). La structure de la population choisie a bien contrôlé l'erreur de type I comme le montrent les graphiques PP. Six

marqueurs (1 haplotype et 5 marqueurs indépendants) significativement liés à la résistance de la plante au SCYLV ont été trouvés. Ces marqueurs sont présent à de faibles fréquences, allant de 8 à 20% confirmant ainsi que cette maladie pourrait avoir une histoire assez récente ainsi qu'une distribution récente, en comparaison des autres maladies de la canne à sucre, par des échanges de matériels végétaux infectés [42]. Les 3 marqueurs AFLP n'ont été détectés qu'avec le modèle GLM. Etant donné que les marqueurs AFLP présentent plus de données manquantes dans le panel de variétés utilisées, il se pourrait que le modèle MLM compressé ne soit pas adapté aux marqueurs avec des données manquantes. Les marqueurs individuels associés à la résistance au SCYLV expliquent entre 4 et 14% de la variation pour tous les types d'échantillonnage des 2 essais. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues dans l'étude d'association réalisée sur la résistance au fusarium head blight (FHB) de l'orge. Cette étude a été réalisée sur une population d'orge provenant d'un programme de sélection prenant en considération 1 niveau environnemental [46]. Les résultats de notre étude sont néanmoins plus faibles que ceux obtenus dans l'étude d'association d'un marqueur individuel au *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) obtenu dans un panel de variétés d'orge pour lequel les corrélations allaient de 25 à 67% [43] ce qui correspond à des r^2 allant de 0,062 à 0,44. Dans notre étude, les 6 marqueurs ont tous été identifiés avec les données phénotypiques des feuilles mais pas avec celles des tiges. Par ailleurs, seuls 2 marqueurs (agccag14 et B424681) étaient communs aux 2 essais indiquant ainsi que les marqueurs d'associations peuvent dépendre de l'environnement comme cela a été observé chez l'orge [46]. La régression multiple des données phénotypiques avec l'ensemble des marqueurs permet d'obtenir jusqu'à 5 marqueurs retenus par le modèle. Dans ce cas, les modèles montrent que les marqueurs retenus par les modèles peuvent expliquer jusqu'à 32% de la variation phénotypique des variétés de canne à sucre quant à l'infection ou la densité virale dans les échantillons de feuilles. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur une autre maladie virale de la canne à sucre, la maladie de Fiji [68]. En effet, dans cette étude, 4 marqueurs expliquent également 32% de la variation phénotypique. Nos résultats montrent que l'un des marqueurs les plus significatifs H484 était spécifique à l'essai A et ce dans les analyses d'association pan-génomiques comme dans les régressions multiples réalisées ce qui indique l'existence d'une interaction génétique x environnement d'autant plus que les deux essais ont subi des pressions parasitaires différentes. De nombreuses études traitent des interactions génétiques x environnement et il peut arriver que des plantes répondent différemment en fonction de l'environnement épidémiologique comme cela a été observé chez le sorgho chez lequel divers génotypes ont été testés dans plusieurs environnements différents pour la maladie de l'ergot (*Claviceps africana*) [48]. Les séquences des marqueurs DArT correspondants à l'haplotype H484,

détecté uniquement dans l'essai A sous forte pression parasitaire, ont été alignées au génome du sorgho dont les gènes ont une bonne colinéarité avec la canne à sucre [22]. L'haplotype H484 est localisé près d'un gène similaire au gène AT3G22400 d'*Arabidopsis thaliana* qui code pour une lipoxygénase (LOX5). Cette enzyme est impliquée dans l'alimentation des pucerons et favorise la colonisation des feuilles d'*Arabidopsis* par le puceron vert du pêcher [50]. Cependant, dans notre étude l'haplotype H484 est un marqueur de résistance alors que la LOX5 est considérée comme étant impliquée dans la régulation négative des systèmes de défense de la plante [50]. Ceci indique que nous avons probablement mis en évidence d'autres gènes qui peuvent avoir une fonction opposée au gène codant pour la LOX5. Toutefois les lipoxygénases sont impliquées dans la synthèse des oxypilines qui sont des inducteurs de réactions de défense aux pathogènes et insectes [27]. Un marqueur commun entre les deux essais (B424681) et présent dans tous les modèles de régressions multiples a lui aussi été aligné au génome du sorgho. Ce marqueur se situe près d'un gène similaire au gène AT1G34030 d'*Arabidopsis thaliana* qui code pour une protéine ribosomale 40S (RPS18B). Il est intéressant de noter que la protéine ribosomale 40S est impliquée dans l'initiation de la traduction de l'ARN viral à travers plusieurs mécanismes spécifiques générés par le virus et qui pourraient faire partie du contrôle de la gamme d'hôte des virus infectant les plantes ([29]; [61]). De ce fait, nous pouvons supposer que des variations de la protéine ribosomique 40S sont présentes chez les cannes à sucre (*Saccharum spp*). Ces conclusions doivent être approfondies pour envisager de les utiliser pour la sélection de variétés résistantes au SCYLV.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la génétique d'association pour la résistance à une maladie vectorielle peut être développée chez la canne à sucre. En utilisant des marqueurs adéquats tels que les DArT, les études d'association pangénomique (GWAs) peuvent permettre de mieux comprendre la résistance de la plante au virus ce qui peut être utile pour la sélection de nouvelles variétés. Par contre, une grande partie de la variation n'a pas pu être identifiée dans cette étude. Ceci s'explique par le fait que les 2097 marqueurs indépendants utilisés ici ne couvrent pas tout le génome ni les copies alléliques existant chez la canne à sucre. De plus, la génétique d'association ne permet pas la détection d'allèles utiles en fréquence rare [28]. Cette plante ayant un génome polyploïde et aneuploïde, il n'est pas possible actuellement d'estimer l'effet dose des allèles. Un autre point qu'il faut considérer est la diversité virale du SCYLV ([2]; [3]; [64]; [67]; [66]; [30]). En effet, les génotypes viraux du SCYLV, présents en Guadeloupe, montrent une variation de leur agressivité et de leur virulence [3] qui peuvent conduire à des différences dans les mécanismes de résistance.

V/ Conclusion

La feuille jaune de la canne à sucre est une maladie virale émergente présente dans la majorité des pays producteurs de canne à sucre. La façon la plus durable de lutter contre cette maladie est de sélectionner des variétés de canne à sucre résistantes au virus. Hormis des études utilisant partiellement ces données, aucune étude pangénomique n'a encore été menée à ce jour sur la recherche de marqueurs moléculaires liés à la résistance au SCYLV, agent causal de la feuille jaune. L'objectif de ce travail était d'étudier la possibilité de réaliser des études d'associations pangénomiques visant à mettre en évidence des marqueurs moléculaires de résistance au virus. Pour ce faire, nous avons d'abord déterminé les incidences et les densités virales d'échantillons de feuilles et de tiges de 189 variétés de cannes à sucre. Ces données phénotypiques ont ensuite été couplés à un total de 4189 marqueurs moléculaires (DArT et AFLP).

L'étude phénotypique montre que les 2 essais ont des données divergentes dues au fait que ces essais ont subi des pressions parasitaires différentes. Toutefois, les héritabilités au sens large (H^2) obtenues pour chaque type d'échantillonnage de chaque essai sont élevées ($>0,80$). Ceci indique une bonne évaluation de la variance génétique permettant ainsi d'envisager la recherche de marqueurs moléculaires de résistance au SCYLV. L'étude d'association réalisée ensuite a mis en évidence 6 marqueurs moléculaires de résistance liés au SCYLV (3 marqueurs AFLP et 3 marqueurs DArT). Une synténie existant entre la canne à sucre et le sorgho, les séquences des 3 marqueurs DArT significatifs ont été comparées aux séquences du sorgho. Les fonctions de 2 gènes impliqués dans les interactions plante/pathogène/vecteur ont été trouvées par homologie sur *Arabidopsis thaliana*. Un gène proche d'un des marqueurs code pour une protéine ribosomale impliquée dans la traduction de l'ARN viral, le second marqueur est proche d'un gène lié à la régulation des populations des pucerons.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence des marqueurs moléculaires de résistance au SCYLV. Il s'agit de la première étude d'association pan-génomique menée sur une maladie de la canne à sucre pour laquelle la fonction de gènes de résistance potentiels a été trouvée sur une autre plante.

PARTIE 2: ETUDE DE LA RESISTANCE AUX SCYLVs ET DE SA TRANSMISSION

I/ Introduction

La première partie de l'étude a permis de mettre en évidence 6 marqueurs moléculaires de résistance au SCYLV dans une population de 186 variétés de canne à sucre. Dans le but de sélectionner des variétés de canne à sucre résistantes au SCYLV, il faut s'assurer que le caractère de résistance est transmissible aux descendances. Pour se faire, la méthode prévisionnelle la plus rapide et efficace est de calculer l'héritabilité au sens strict (h^2) du caractère étudié. Ce calcul se fait en général à partir de régressions linéaires de la valeur des descendances sur la valeur des géniteurs. L'héritabilité correspond alors à la pente de la droite de régression et est comprise entre 0 et 1. Plus la valeur obtenue est proche de 1, plus le caractère se transmet facilement aux descendances et donc plus il est facile de programmer des croisements pour sélectionner des variétés portant ce caractère. Des études portant sur l'héritabilité au sens strict de caractères de résistances à des maladies ont déjà été conduites sur des plantes. Une étude a été menée sur l'héritabilité de la résistance à un autre *Potatovirus*, le *Potatoe leaf roll virus* [9] qui entraîne une nécrose des tissus chez les *Solanaceae* (pomme de terre) et en particulier des tissus vasculaires des feuilles. De plus, des études d'héritabilité de résistance à des maladies ont également été conduites sur des maladies fongiques de la canne à sucre, notamment sur la résistance à la rouille [54], au charbon [12] et à la morve rouge [70]. Toutefois la diversité du pathogène peut engendrer des variations dans la résistance des plantes ou annihiler des gènes de résistance [35]. En Guadeloupe, une étude a été menée sur la diversité virale du SCYLV et la réponse potentiellement variable des variétés de canne à sucre. L'étude a été menée sur des cannes à sucre issues de culture in-vitro (civ) après inoculation des vitroplants par le vecteur [3] et montre des variabilités de la capacité d'infection et de la virulence des différents génotypes du SCYLV étudiés. Plus en détail, le taux d'infection du génotype CUB était supérieur à celui des 2 autres génotypes viraux et les génotypes CUB et BRA-PER du SCYLV possèdent un pouvoir pathogène supérieur à celui du génotype REU. En effet, ces 2 génotypes ont infecté toutes les variétés étudiées et ont induit des symptômes de jaunissement sur les plantes sensibles contrairement au génotype REU.

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'héritabilité de la résistance au SCYLV tout en tenant compte de la diversité présente et connue du virus. A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a encore été menée sur ce virus.

II/ Matériel et méthode

2.1/ Matériel végétal

2.1.1/ Géniteurs potentiels

Un essai constitué de 189 variétés de cannes à sucre originaires des principaux centres de sélections d'origine mondiale a été planté en trois blocs complets. Cet essai a été suivi sur 3 années. Parmi ces 189 variétés, 41 (Tableau 7) ont été sélectionnées en fonction de leur résistance relative au SCYLV et de leur fertilité pollinique.

Tableau 7: 41 variétés de canne à sucre sélectionnées pour les croisements.


Variétés	Origines	Variétés	Origines
BBZ85102	Barbade-Belize	L66-97	Pakistan
BJ821018	Barbade-Jamaïque	LCP86-454	USA
Co1148	Inde	LF52-3082	Fidji
Co1186	Inde	LF61-00	Fidji
Co290	Inde	LF65-3661	Fidji
Co312	Inde	M695/69	île Maurice
Co740	Inde	MEX57-473	Mexique
Co842	Inde	MEX71-1235	Mexique
Co997	Inde	MQ76/53	Australie
CP61-84	USA	MY51-05	Cuba
CP62-258	USA	MY54-129	Cuba
CP84-1198	USA	N14	Afrique du Sud
CP85-1432	USA	N52-219	Afrique du Sud
CP86-1633	USA	N53-216	Afrique du Sud
F148	Taiwan	POJ213	Java
FR90253	France (Guadeloupe)	Q108	Australie
FR91253	France (Guadeloupe)	Q140	Australie
FR941006	France (Guadeloupe)	R575	France (La Réunion)
H69-9092	USA (Hawaï)	SP73-3108	Brésil
H72-8597	USA (Hawaï)	TUC74-06	Argentine
JA64-20	Cuba		

Le taux d'infection de 40 des 41 variétés sélectionnées a été mesuré en repousse 2 et 3. Ces 40 variétés ont été échantillonnées pour mesurer l'incidence du SCYLV par immuno-empreinte de tissus foliaires. Nous avons prélevé 10 feuilles par variété et par bloc en novembre 2009 et en octobre 2010 (soit un total de 60 échantillons par clone). Après réalisation des empreintes, les feuilles ont été conservées au congélateur (-20°C) pour ensuite permettre de détecter, dans les feuilles diagnostiquées positives, les différents génotypes viraux du SCYLV par RT-PCR. Les génotypes viraux ont été diagnostiqués dans des lots formés des échantillons positifs de chaque parcelle pour un cycle de récolte donné.

Certaines de ces variétés ont ensuite été croisées entre elles en octobre 2008. Sur 46 croisements, seuls les croisements effectués avec des porte-graines mâles stériles et donnant suffisamment de descendance pour l'étude envisagée ont été retenus (Tableau 8)

Tableau 8 : 10 croisements retenus pour l'étude

Mère	Père	Croisements
N53-216	LF52-3082	X 08 003
TUC74-06	LF52-3082	X 08 007
TUC74-6	SP73-3108	X 08 021
Q140	SP73-3108	X 08 024
LF61-00	CP84-1198	X 08 026
FR90253	CO997	X 08 029
M695/69	MQ76/53	X 08 040
CP85-1432	H72-8597	X 08 046
CP85-1432	BBZ85102	X 08 051
Q140	H72-8597	X 08 057

 pas présent dans l'essai 2

2.1.2/ Essais sur les descendance

Seuls 10 croisements biparentaux sur les 46 effectués ont donné un nombre suffisant de descendance pour pouvoir être plantés dans au moins un essai. Toutefois, seuls 7 croisements ont pu être plantés dans les deux essais successifs (Figure 16). Le premier essai, planté le 12 Mai 2010 est donc constitué des 10 croisements. Chaque croisement est planté sur trois parcelles réparties aléatoirement et contenant chacune 25 individus. Une variété connue quant à sa sensibilité à l'infection par le SCYLV, la variété SP71-6163 issue de vitro-plants sains, fait partie du dispositif et nous permet de mesurer l'homogénéité de l'infection dans les deux essais.

Le deuxième essai, planté le 6 Juin 2010 est constitué de 7 croisements. En effet, pour trois croisements (X08 021, X08 026 et X08 057) nous n'avions pas un nombre suffisant de plants pour l'essai 2. L'essai 2 est similaire à l'essai 1 et contient donc également 3 parcelles de SP71-6163. Un premier contrôle de l'infection a été réalisé à 5-6 mois, soit en Octobre 2010 par immuno-empreinte de feuilles afin de contrôler l'homogénéité de l'infection dans les parcelles témoins. Au premier contrôle, la contamination des parcelles témoins n'était pas homogène dans l'essai 1 ni entre les 2 essais. En effet, les trois parcelles de l'essai 1 présentent des taux de contamination de 29, 77 et 71% alors que celles de l'essai 2 ont des taux de contamination de 100, 100 et 90%. De ce fait, les deux essais ont été coupés à un mois d'intervalle (Novembre et Décembre 2010) afin de favoriser l'infection virale par immigration du vecteur sur les essais. Un deuxième échantillonnage de contrôle a été réalisé en repousse en Mai 2011.

Essais 1	X08 046	X08 029	X08 057	SP71-6163	X08 023*
	X08 057	X08 024	X08 003	SP71-6163	X08 051
	X08 021	X08 026	X08 040	X08 046	X08 021
	X08 024	X08 026	X08 021	SP71-6163	X08 023*
	X08 040	X08 029	X08 003	X08 051	X08 007
	X08 003	X08 007	X08 024	X08 026	X08 029
	X08 007	X08 051	X08 046	X08 023*	X08 040

1m50

Essais 2	X08 046	X08 029	X08 040	SP71-6163	X08 051
	X08 003	X08 007	SP71-6163	X08 029	X08 024
	X08 024	X08 046	X08 023*	X08 046	X08 051
	X08 051	X08 046	X08 024	X08 003	X08 007
	X08 003	X08 029	SP71-6163	X08 040	X08 007

* X08 023 pas étudié

Figure 16: Plan des champs de descendance des essais 1 et 2.

Echantillonnage :

Chaque plant issu des croisements sélectionnés a été échantillonné dans les 2 essais. Le 1^{er} essai a été échantillonné le 3 Mai 2011 et le 2^{ème} essai le 6 Juin 2011. Ce qui correspond à un total de 75 à 150 échantillons par croisement. La présence du SCYLV a été diagnostiquée par immuno-empreinte. Les feuilles positives ont été conservées au congélateur pour le diagnostic des génotypes viraux du SCYLV. Ceux-ci ont été diagnostiqués par RT-PCR sur les feuilles positives regroupées pour chaque parcelle en lots de 5 feuilles maximum. Si dans une parcelle plus de 5 feuilles positives ont été diagnostiquées, alors plusieurs lots ont été faits.

Le témoin sensible SP716163 présent dans les deux essais des descendance nous a permis de vérifier le taux et l'homogénéité de la contamination naturelle des 2 essais par le SCYLV. En effet, l'essai 1 présente des taux de contamination de 61, 77 et 71% pour chacune des parcelles témoins et pour l'essai 2 les contaminations sont de 100, 100 et 90%. Les données recueillies pour les descendance ont été pondérées en fonction du taux de contamination moyen du témoin sensible dans chaque essai dont le taux était respectivement de 0,7 et 0,96 pour les essais 1 et 2.

2.2/ Diagnostique viral par immuno- empreinte de feuilles

Les feuilles prélevées correspondent à la 1^{ère} feuille à ochréa visible (Figure 11 p 32).

Cette méthode est rapide et peu coûteuse comparée aux techniques de diagnostique de biologie moléculaire. Elle permet également un premier diagnostique qui permet d'éliminer les feuilles négatives au SCYLV et de ne conserver pour la RT-PCR que les feuilles dans lesquelles le virus a été diagnostiqué.

Tous les échantillons de feuilles ont été imprimés sur des membranes de nitrocellulose (Millipore, Protran BA85, 0,45 µm). Le protocole utilisé concernant cette méthode de détection a été décrite dans la partie 1 (page 33).

2.3/ Diagnostique des différents génotypes viraux du SCYLV

Le diagnostique des différents génotypes viraux s'est fait par Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Cette technique de biologie moléculaire est très utilisée en particulier pour l'étude des virus à ARN. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (Phase RT). L'ADN complémentaire obtenu est ensuite amplifié par PCR. La difficulté majeure de cette méthode concerne la préparation des ARNs qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés.

2.3.1/ Extraction d'ARN :

Les ARN totaux des feuilles prélevées ont été extraits en utilisant le RNeasy plant mini kit (Qiagen) par lot de feuilles comme définis pour chaque essai.

Protocole :

Les lots de feuilles encore congelées ont été coupés en petits morceaux au scalpel et aux ciseaux stériles et 200 mg de matériel végétal a été mis dans des tubes contenant du sable et des billes de céramique. 900µl d'un tampon de lyse constitué de tampon RLT (RNeasy Lyse buffer) et de 10µl de βmercaptoethanol par ml de tampon. Ces tubes ont ensuite été placés dans un broyeur (MP biomedical). Afin de bien séparer le sable du matériel végétal, les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 6 minutes à 16 000g. Le lysat obtenu pour chaque tube est déposé dans une colonne violette et centrifugé pendant 2 minutes à 20 000g. Pour chaque tube, 0,5 ml du filtrat obtenu est mélangé à 225µl d'éthanol absolu (conservé à -20°C). Le mélange obtenu est agité légèrement à la main avant d'être transféré dans une colonne rose avec 700µl de tampon RW1. Les colonnes roses ont ensuite été centrifugées 15 secondes à 9000g. Le filtrat obtenu est éliminé et la colonne lavée une première fois avec du tampon RPE pendant 15 secondes puis centrifugé à 9 000g. Le filtrat est à nouveau éliminé et la colonne lavée une deuxième fois avec du tampon RPE pendant 2 minutes à 20 000g. L'ARN total est ensuite récupéré en déposant 40µl d'eau RNase free au centre de la colonne rose, placée dans un tube de 1,5ml, et en centrifugeant l'ensemble pendant 1 minute à 9 000g. Les tubes contenant les ARN totaux obtenus sont ensuite conservés à -20°C.

2.3.2/ Reverse Transcriptase Polymerase Chain

Reaction (RT-PCR) :

La RT-PCR est une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Nous avons utilisé le kit Qiagen one step RT-PCR. Il s'agit d'un protocole mélangeant les réactifs de RT et de PCR afin que les deux étapes puissent se faire sans avoir à ouvrir les tubes ce qui permet de réduire le risque de contamination. Les amorces spécifiques utilisées pour détecter les trois génotypes viraux identifiables (BRA-PER, CUB et REU) sont BRA-PER-For/BRA-PER-Rev, CUB-For/CUB-Rev et REU-For/REU-Rev [\[4\]](#) (Tableau 9).

Tableau 9: Détail des amorces utilisées pour la détection des trois génotypes viraux

génotypes viraux	nom de l'amorce	position dans génome	séquence 5'-3' ^a
BRA-PER	BRA-PER-For	1,905-1,924	AACTGCTGCgtcAgGCCcCa
	BRA-PER-Rev	2,267-2,246	GACGAGCtTGCGTTGTttttCt
CUB	CUB-For	423-443	gTGCttcTCCcgGCGGTTcact
	CUB-Rev	873-853	attcGaGAACAACCTcCgcctc
REU	REU-For	3,540-3,558	CAAgCTtCTAGCgGGaaTc
	REU-Rev	4,445-4,427	CAGTTGCTCaATGCTCCAcG

^a : les exposants polymorphiques sont écrits en petit caractère

Chaque microtube de réaction contient 12,05µl d'eau DEPC, 5µl de solution Q, 5µl de tampon 5X, 0,5µl de dNTP, 0,1µl d'amorce spécifique For ([0,4mM]), 0,1µl d'amorce spécifique Rev ([0,4mM]), 1µl de mix RT PCR, 0,25µl de inhibiteur de RNase et 1 µl d'ARN extrait. Le volume total du tube est de 25µl. Le programme du thermocycleur utilisé est composé de plusieurs étapes. La phase de transcription inverse dure 30 minutes à 50°C. La phase d'amplification du fragment synthétisé dure 15 minutes à 94°C suivi de 35 cycles comprenant chacun : une minute à 94°C (initiation), une minute à 56°C (hybridation) et une minute à 72°C (élongation). Enfin, la phase finale d'élongation dure 10 minutes à 72°C. Le thermocycleur reste finalement en pause à 15°C jusqu'à ce que l'on récupère les tubes contenant les ADN amplifiés. Les produits PCR de chaque tube sont ensuite mélangés à du bleu de charge (1,5µl de bleu de charge + 9µl de produits PCR). Le mélange obtenu est alors déposé dans un puits d'un gel d'agarose à 1% (agar + TBE0.5X + GelRed). Le gel est ensuite mis à migrer pendant environ 20 à 25 minutes à 100V.

Les fragments amplifiés et spécifiques à chaque génotype viral sont ensuite visible sous UV.

Les estimations des incidences des différents génotypes viraux ont été calculées à partir des densités des bandes obtenues sur le gel (figure 17). Les incidences SCYLV calculées ont donc été multipliées par 1, 0,5 ou 0 (génotype non détecté) pour obtenir l'incidence des différents génotypes viraux. Ce calcul a été fait pour chaque génotype et chaque lot de feuilles diagnostiquées.

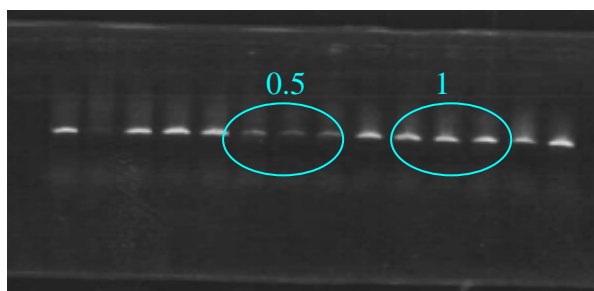


Figure 17: Gel d'agarose montrant l'estimation de l'incidence chez les génotypes viraux étudiés en fonction de la densité des bandes obtenues

2.4/ Traitement des données

2.4.1/ Analyses statistiques

Toutes les données d'incidences globales ainsi que celles des estimations d'incidence de chaque génotype viral ont été traitées avec le logiciel SAS version 9.3. Avant toutes analyses, elles ont été transformées avec la fonction $\arcsin(\sqrt{\text{incidence}})$.

Des analyses de variances ont été menées sur les données des géniteurs et de leurs descendances en utilisant la procédure GLM (modèle linéaire généralisé). Le modèle $I_c = \text{clone}|\text{cycle}$ a été utilisé pour les géniteurs et le modèle $I_c = \text{croisement}|\text{essai}$ pour les descendances.

Cette analyse a permis de déterminer des effets clones et cycles et l'interaction clone*cycle pour chaque génotype présent dans les données des géniteurs. Des effets croisements, essais et l'interaction croisement*essai ont été déterminées pour les descendances.

Des régressions linéaires simples ou multiples (stepwise multiple regression model) ont été réalisées sur toutes les données transformées des géniteurs et des descendances entre l'incidence globale du SCYLV et celle de chaque génotype viral.

Des régressions linéaires ont également été réalisées avec les 6 marqueurs significatifs déterminés dans la partie 1 sur les phénotypes en lien avec les différents génotypes du SCYLV des 40 géniteurs sélectionnés pour cette partie.

2.4.2/ Héritabilité au sens strict (h^2) :

L'héritabilité au sens strict (h^2) est définie comme étant la proportion de la variance phénotypique [$\text{Var}(P)$] due à la variance génétique additive [$\text{Var}(A)$] (allélique) selon l'équation :

$$h^2 = \frac{\text{Var}(A)}{\text{Var}(P)}$$

L'héritabilité au sens strict (h^2) peut être calculée à partir de la régression de la valeur des descendances sur la valeur des géniteurs. Si la régression linéaire des descendances est faite sur le parent moyen, alors, l'héritabilité correspond à la pente de la droite de régression (a). Si la régression est faite sur un seul des deux géniteurs, alors, l'héritabilité correspond à 2 fois la valeur de la pente de la droite de régression ($2a$) [24]. La valeur de h^2 est comprise entre 0 et 1. Nous avons calculé les héritabilités au sens strict (h^2) pour l'incidence globale du virus (SCYLV) mais aussi pour chaque génotype viral en faisant des régressions des valeurs des descendances sur la valeur des

géniteurs moyens mais aussi sur la valeur du géniteur mâle et du géniteur femelle. Etant donné que pour le 1^{er} croisement les valeurs d'incidence des différents génotypes viraux étaient inconnues pour le géniteur femelle, nous avons décidé pour ce calcul de supprimer ce croisement afin d'homogénéiser les résultats et de pouvoir les comparer avec les valeurs obtenues pour l'incidence globale du virus.

III/ Résultats

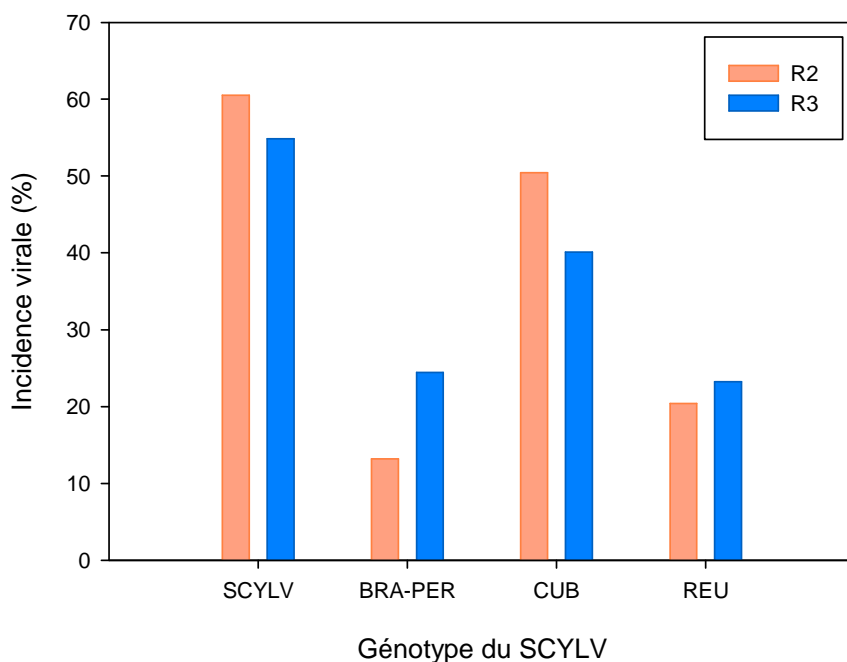
3.1/ Essai 40 géniteurs potentiels

Parmi les géniteurs, le génotype viral CUB a été détecté dans toutes les variétés de cannes à sucre infectées soit 39 variétés. Le génotype viral BRA-PER lui, était présent dans 35 variétés et le génotype REU dans 30 des variétés de canne à sucre (Tableau 10).

Tableau 10 : Répartition des différents génotypes viraux chez 40 géniteurs pour les 2 cycles de culture confondus.

	non infecté				
		CUB			
			BRA-PER		
				REU	
Nombre de variétés	1	2	7	28	2

Les études de variance effectuées avec le modèle GLM ont montré qu'il n'existait d'effet cycle que pour les données d'incidence du génotype viral BRA-PER pour les géniteurs. Pour les autres génotypes viraux et les données globales (SCYLV), seul l'effet clone a pu être démontré (Figure 18).



Génotypes viraux présents chez les 40 géniteurs en R2 et R3

Figure 18 : Incidence moyenne du SCYLV et de ses génotypes présents en Guadeloupe pour les 40 géniteurs potentiels (R2 et R3)

Les régressions linéaires entre les incidences du SCYLV et celles des génotypes viraux nous a permis de comprendre la part de variation expliquée par chaque génotype viral chez les géniteurs. Les valeurs du coefficient de détermination (r^2) entre l'incidence du SCYL et l'incidence des génotypes du SCYLV BRA-PER CUB et REU sont respectivement de 0,43, 0,88 et 0,50. Quand une régression multiple est faite avec les trois génotypes viraux en même temps, le modèle ne conserve que les génotypes viraux CUB et BRA-PER avec des r^2 respectifs de 0,88 et 0,07 ce qui donne un r^2 total de 0,95. De même, lorsque la régression multiple est effectuée avec les génotypes CUB et REU, seul le génotype viral CUB est retenu par le modèle avec un r^2 de 0,88.

Etant donné que dans la première partie de l'étude nous avons déterminé 6 marqueurs moléculaires de résistance au SCYLV (acacta12, agccag14, agccta51, B424681, Ha 484 et B424752), nous avons effectué des régressions linéaires multiples de ces marqueurs sur les valeurs d'incidence des 40 géniteurs potentiels. Quand la régression est faite sur les données d'incidence globale, le seul marqueur retenu par le modèle parmi les six est le marqueur DArT B424681 avec un r^2 de 0,33. De la même manière, pour les génotypes viraux CUB et REU le marqueur B424681 est le seul avec des r^2 respectifs de 0,39 et 0,16. En ce qui concerne le génotype viral BRA-PER, deux marqueurs sont retenus par le modèle : acacta12 avec un r^2 de 0,12 et agccag14 avec un r^2 de 0,07.

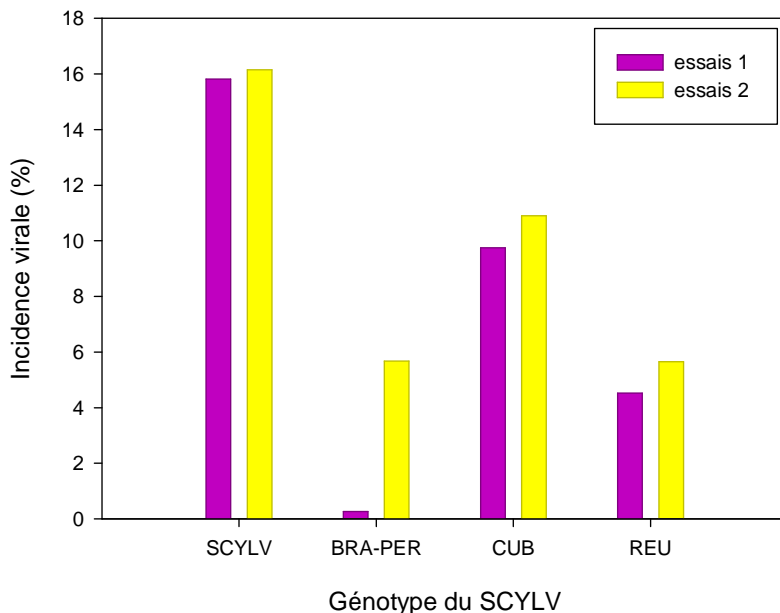
3.2/ Essai sur les descendance

En ce qui concerne les descendance, le génotype viral CUB est détecté dans 9 croisements, le génotype BRA-PER dans 7 d'entre eux et enfin le génotype REU à été détecté dans 7 croisements (Tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des différents génotypes viraux dans les 10 croisements pour les 2 essais

	non infecté				
				CUB	
				BRA-PER	
					REU
Nombre de descendance issues de croisements	1	1	1	6	1

Les études des sources de variations effectuées avec le modèle GLM montrent qu'il n'y a chez les descendance que l'effet croisement qui agit à l'exception du génotype viral BRA-PER pour lequel il n'y a aucun effet croisement mais un effet essai (figure 19).



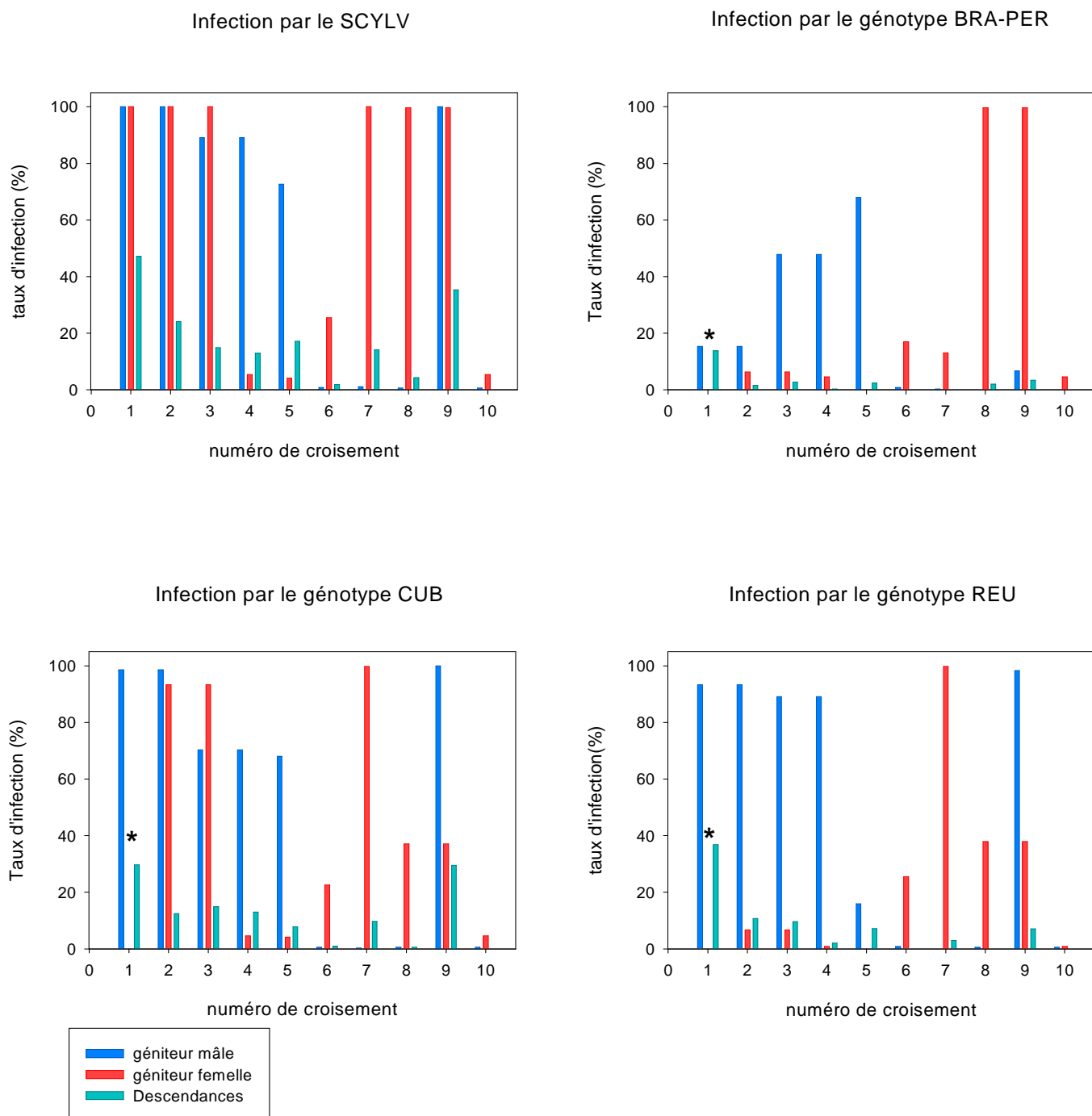
Génotypes viraux présents dans les descendance dans les 2 essais

Figure 19: Incidence moyenne du SCYLV et de ses génotypes présents en Guadeloupe pour les descendance (essais 1 et 2)

Une comparaison a été effectuée entre les données de chaque croisement pour l'incidence globale du SCYLV afin de savoir quels croisements avaient des résultats identiques. Ainsi, lorsque l'on compare 2 croisements, plus la valeur de p est proche de 1, plus les croisements sont similaires (croisements 7 et 5) (Tableau 12).

Tableau 12: valeurs de P obtenues pour les tests de comparaison (F) entre les 10 croisements quand à l'incidence du SCYLV :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,09	0,05	0,01	0,07	<,0001	0,02	0,00	0,40	0,00
2			0,51	0,32	0,63	0,01	0,40	0,04	0,39	0,02
3				0,88	0,88	0,14	0,96	0,29	0,18	0,09
4					0,74	0,11	0,91	0,27	0,07	0,07
5						0,10	0,82	0,22	0,24	0,06
6							0,11	0,61	0,00	0,51
7								0,24	0,10	0,07
8									0,01	0,31
9										0,00
10										



* : pas d'informations sur les génotypes viraux qui infectent le géniteur femelle du croisement 1

Figure 20 : Taux d'infection du SCYLV et de ses trois génotypes mesurés chez les géniteurs et les descendances pour les 10 croisements étudiés

Les 14 géniteurs choisis présentent une infection virale représentative des 186 variétés étudiées précédemment. Les géniteurs mâles et femelles sélectionnés sont conformes à cette distribution c'est-à-dire qu'ils présentent une proportion équivalente de variétés résistantes et sensibles au virus. Les descendances obtenues présentent une infection virale inférieure à 20% pour la majorité des croisements. Trois géniteurs mâles ont été utilisés dans 6 des croisements (croisements 1- 2, 3- 4 et 8- 10). De la même façon, trois géniteurs femelles ont été utilisés dans les croisements 2- 3, 4- 10 et 8- 9. Ceci peut permettre de comparer les descendances obtenues avec un géniteur commun. Les croisements 8 et 10 qui ont le même géniteur mâle résistant mais des géniteurs femelles de sensibilité opposée ont une descendance résistante au virus. De même, les croisements 8 et 9 ont un géniteur femelle sensible et des géniteurs mâles de sensibilité au virus opposés génèrent une descendance dont la sensibilité virale est liée à celle de leurs géniteurs mâles respectifs. D'autres croisements obtenus donnent le même résultat et laissent supposer que le géniteur femelle n'intervient pas dans le degré de sensibilité de leur descendance (croisements 3 et 4 de même géniteur mâle et de géniteur femelle sensible). Cependant, ceci n'est pas observable dans tous les croisements réalisés. Dans 1 cas, la contamination de la descendance ne correspond pas à celle du géniteur mâle (croisements 7). Les 3 croisements réalisés avec deux géniteurs infectés à près de 100% par le SCYLV (croisements 1, 2, et 9), donnent les 3 descendances les plus infectées de valeurs non différentes au seuil de 0,5%.

La majorité des géniteurs et des descendances sont contaminés par le génotype viral CUB et dans une moindre mesure par le génotype REU. Seuls trois géniteurs sont contaminés par le génotype viral BRA-PER à plus de 20%. Ce génotype viral est détecté en faibles proportions dans les descendances (Figure 20).

Les régressions linéaires entre les incidences du SCYLV et celles de ses génotypes des descendances montrent que pour chaque génotype, nous obtenons des r^2 de 0,21 pour BRA-PER, 0,73 pour CUB et 0,49 pour REU. Lorsque la régression linéaire multiple est faite avec les trois génotypes viraux, nous obtenons un r^2 total de 0,82 avec pour chaque génotype viral des r^2 de 0,73 pour CUB, 0,07 pour REU et 0,02 pour BRA-PER.

En générale, les héritabilités au sens strict (h^2) obtenues avec le géniteur moyen sont moyennes ($0,25 < h^2 < 0,40$). Les valeurs d'héritabilité sont importantes quand elles sont calculées avec les valeurs du géniteur mâle et faibles et non significatives avec les valeurs du géniteur femelle.

Aucune héritabilité significative n'a pu être déterminée pour le génotype viral BRA-PER sauf quand elle est calculée avec le géniteur commun (Tableau 13).

Tableau 13 : Héritabilité au sens strict (h^2) pour chaque donnée. (calculée sur la base de 9 croisements)

	géniteur	a	r^2	p	h^2
SCYLV	moyen	0,3471	0,5647	0,0122	0,35
	mâle	0,278	0,7037	0,0024	0,56
	femelle	0,1885	0,2951	0,1046	0,38
BRA-PER	moyen	0,2476	0,6559	0,0081	0,25
	mâle	0,1005	0,2357	0,1852	0,2
	femelle	0,0549	0,1621	0,2827	0,11
CUB	moyen	0,3597	0,699	0,005	0,36
	mâle	0,2445	0,6998	0,0049	0,49
	femelle	0,1273	0,1304	0,3397	0,25
REU	moyen	0,2777	0,4123	0,0622	0,28
	mâle	0,1623	0,5419	0,0237	0,32
	femelle	-0,0323	0,012	0,7794	-0,06

a : pente de la droite de régression linéaire simple

IV/ Discussion

La présente étude avait pour but de déterminer si la transmission de la résistance au SCYLV aux descendances était possible en tenant compte de la diversité virale existant en Guadeloupe. Afin d'atteindre cet objectif, 41 variétés de cannes à sucre ont été sélectionnées comme géniteurs mâles et femelles potentiels. Pour une de ces variétés, l'incidence virale globale a bien été évaluée mais nous n'avons pas pu déterminer quels génotypes viraux l'infectaient.

L'étude de l'incidence de trois génotypes du SCYLV différenciables (BRA-PER, CUB et REU) des 40 variétés montre que le génotype viral CUB est présent dans toutes les variétés pour lesquelles le SCYLV a été détecté. Les génotypes viraux BRA-PER et REU, eux, n'ont été détectés dans la même variété qu'en présence du génotype viral CUB.

Les études de variances menées avec le modèle GLM montrent que le génotype viral BRA-PER est le seul à présenter un effet cycle significatif. En effet, ce génotype est 2 fois plus représenté en repousse 3 qu'en repousse 2.

Les régressions réalisées entre les différents génotypes viraux et l'incidence du SCYLV montrent que le génotype viral CUB est le mieux modélisé. En effet, ce génotype viral explique 88% de la variation due au modèle chez les géniteurs. Cette valeur reste la même lorsqu'une régression multiple est réalisée avec tous les génotypes viraux en même temps. Ceci indique que la résistance au SCYLV correspond essentiellement à celle mesurée pour le génotype CUB. Par contre seuls les

génotypes viraux CUB et BRA-PER sont conservés par le modèle. De même quand la régression est faite avec les génotypes CUB et REU, seul le génotype CUB est conservé par le modèle. Ceci montre que le génotype CUB englobe le génotype REU. Donc si l'on sélectionne des variétés résistantes au génotype CUB, elles le seront certainement au génotype REU.

La première partie de la thèse a permis de mettre en évidence 6 marqueurs moléculaires liés à la résistance au SCYLV sur une population de 186 variétés de cannes à sucre d'où sont issues les 41 géniteurs potentiels sélectionnés. Des régressions multiples ont été réalisées afin de savoir quelle part les 6 marqueurs de résistance peuvent expliquer de la diversité virale chez les 40 variétés de cannes à sucre. Il en résulte que le marqueur DArT B424681, lié à une protéine ribosomale, explique 39% de la variation liée au génotype CUB et 16% de celle liée au génotype REU. Ce marqueur est également le seul retenu expliquant 33% de la variation dans la régression multiple sur les données globales (SCYLV). En ce qui concerne le génotype viral BRA-PER, deux marqueurs AFLP ; le acacta12 et le agccag14 expliquent respectivement 12 et 7 % de la variation lié à ce génotype alors que le marqueur B424681 n'est pas retenu. Ces résultats montrent que le génotype viral BRA-PER présente une résistance différente de celle des 2 autres génotypes du SCYLV.

Parmi les 41 variétés sélectionnées comme géniteurs potentiels, 14 ont permis de réaliser 10 croisements biparentaux.

La répartition des génotypes viraux dans l'essai des descendance montre que le génotype CUB est présent dans tous les croisements où le virus a été détecté. Les génotypes BRA-PER et REU ne sont détectés ensemble dans les croisements qu'en présence du génotype CUB. Ce qui donne une répartition des génotypes dans les plantes infectées similaire à celle obtenues précédemment pour les 40 variétés analysées.

Les résultats des études GLM réalisées sur les descendance montrent que seul le génotype viral BRA-PER présente un effet essai. En effet, les autres génotypes viraux et les données globales (SCYLV) seul l'effet croisement est significatif. Ceci s'explique par le fait que, comme pour les 40 géniteurs potentiels, le génotype BRA-PER varie significativement entre les deux essais. Il est possible que le vecteur ait une préférence pour les génotypes viraux CUB et REU entraînant ainsi une contamination plus lente par le génotype viral BRA-PER. D'un autre côté, le mode de circulation du virus étant mal connu, il est possible que le génotype viral BRA-PER soit mal réparti à l'intérieur de la plante ou que celui-ci y circule moins bien.

Les régressions réalisées entre les génotypes viraux et les incidences du SCYLV montrent que le génotype viral CUB est le mieux modélisé chez les descendance expliquant 73% de la variation du

modèle. Cette valeur reste la même lorsqu'une régression multiple est réalisée avec tous les génotypes viraux. Ceci indique que, comme chez les 40 géniteurs potentiels, l'héritabilité de la résistance au SCYLV correspond essentiellement à celle mesurée avec le génotype CUB. Par contre le génotype viral BRA-PER est peu représentatif de la maladie car il n'explique que 21 % de la variation de l'incidence du SCYLV chez les descendances.

Les résultats obtenus pour les descendances des 14 géniteurs sont comparables à ceux obtenus pour les 41 géniteurs potentiels. Les 41 géniteurs présélectionnés pour cette étude et les descendances partageraient une base génétique commune quant à la résistance aux différents génotypes du SCYLV.

Afin de déterminer la transmission aux descendances de la résistance au SCYLV et à ses différents génotypes présents en Guadeloupe, l'héritabilité au sens strict du caractère a été calculée. Les calculs ont été faits sur 9 des 10 croisements car la détection des différents génotypes viraux n'a pas pu se faire sur le géniteur femelle du 1^{er} croisement. Les héritabilités au sens strict (h^2) sont du même ordre de grandeur quand elles sont calculées avec le géniteur commun, avec le géniteur mâle et avec le géniteur femelle. Les héritabilités moyennes mais très significatives, obtenues avec la régression des descendances sur le géniteur moyen indiquent que la sélection pour ce caractère de résistance est faisable. Les héritabilités calculées avec les valeurs du géniteur mâle sont bonnes sauf pour le génotype BRA-PER. Par contre, les valeurs d'héritabilité obtenues avec le géniteur femelle sont faibles et non significatives. Ceci signifie que la résistance au virus est bien transmise du géniteur mâle à la descendance dans les croisements étudiés. Ces résultats sont confirmés dans certains croisements de géniteurs communs pour lesquels le degré de résistance géniteur femelle ne semble pas transmis à la descendance. Dans cette étude, les héritabilités obtenues sont relativement faibles car inférieures à 0,40. La variance phénotypique est donc très supérieure à la variance additive. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cannes à sucre correspondant aux géniteurs sont présentes sur le terrain depuis plusieurs années et sont donc confrontées au virus depuis longtemps. De ce fait, les contaminations de ces variétés étaient déjà très importantes voire maximales. Les descendances quant à elles, au moment de l'échantillonnage, n'étaient sur le terrain que depuis une année et n'ont pas forcément atteint leurs contaminations maximales. Cette différence est liée à l'effet environnemental relatif au temps d'exposition au virus et donc à pour conséquence de diminuer les valeurs d'héritabilité de la résistance au virus. Toutefois la valeur obtenue pour l'héritabilité de la résistance au SCYLV est similaire aux études menées sur la canne à sucre concernant l'héritabilité de la résistance à trois champignons : la rouille [54], le charbon [12] et la morve rouge [70]. Les héritabilités pour ces trois études ont été calculées sur le géniteur commun et

présentent des valeurs de 0,40 à 0,52 pour la résistance à la rouille, de 0,19 à 0,31 pour la résistance à certains caractères de la morve rouge et enfin de 0,41 (en canne plantée) et 0,38 (première repousse) pour le charbon. Dans ces trois études, le caractère de résistance est moyennement héritable sauf pour l'étude de la résistance à certains caractères de la morve rouge pour lesquels des héritabilités faibles ont été enregistrées. Dans notre étude, nous obtenons des héritabilités calculées sur le géniteur moyen, pour le SCYLV ainsi que pour les différents génotypes viraux étudiés, comprises entre 0,25 et 0,36. Par ailleurs, dans une étude réalisée sur un autre *Polerovirus*, le *Potatoe leaf roll virus* (PLRV) de la pomme de terre l'héritabilité de la résistance à ce virus est élevé [9]. Dans cette étude, les parents et leurs descendances ont été plantés à la même date et suivis pendant 2 années. L'infection virale s'est faite par des pucerons d'élevage porteurs du PLRV. Ils ont alors pu obtenir une héritabilité au sens strict de la résistance au virus de 0,72 pour le parent commun. Il est donc envisageable, pour la résistance de la canne à sucre au SCYLV, d'obtenir des héritabilités comparables si les conditions de contamination sont les mêmes pour les géniteurs et leurs descendances.

V/ Conclusion

La feuille jaune est une maladie d'origine virale qui peut entraîner de lourdes pertes de rendements chez les variétés de cannes à sucre les plus sensibles. Afin de lutter efficacement et à long terme contre ce virus, il faut sélectionner des variétés de cannes à sucre résistantes à l'infection par le SCYLV. L'étude d'association réalisée dans la première partie de la thèse a montré qu'il était possible d'envisager cette sélection. Toutefois, pour ce faire, il convient de tenir compte de la diversité virale existante. En effet, en Guadeloupe, 3 génotypes viraux identifiables par RT-PCR sont présents naturellement sur la station de recherche mais aussi dans les champs commerciaux.

Afin d'évaluer la transmission de la résistance au SCYLV aux descendances en tenant compte de la diversité virale existant en Guadeloupe, nous avons présélectionné et étudié 41 variétés de canne à sucre. Parmi celles-ci, 14 ont été croisées et ont permis d'étudier les descendances de 10 croisements.

L'étude montre que les variétés résistantes au génotype CUB le sont aussi en majorité au génotype REU. De plus, ces deux génotypes du SCYLV sont également liés à un même marqueur moléculaire de résistance. Par contre en ce qui concerne le génotype viral BRA-PER, les résultats obtenus sont particuliers et spécifiques. De plus, deux marqueurs de résistances différents sont liés à

la résistance au génotype viral BRA-PER. Il en résulte donc qu'il suffit de sélectionner des cannes à sucre résistantes aux génotypes viraux CUB et BRA-PER pour couvrir une majeure partie de la résistance au SCYLV. Les résultats obtenus sont spécifiques aux variétés choisies pour les croisements réalisés et à leurs descendances ainsi qu'aux conditions du milieu. En effet, la Guadeloupe est l'un des rares milieux où sont présents naturellement les trois génotypes viraux étudiés ici. Les résultats d'héritabilités obtenus dans cette étude sont quelque peu biaisés du fait que les géniteurs et leurs descendances n'aient pas été en présence du virus pendant la même période et en même temps. Malgré tout, les valeurs obtenues sont très significatives. Il est donc possible de sélectionner en Guadeloupe de nouvelles variétés de canne à sucre résistantes au virus. Toutefois il serait souhaitable d'étendre les études d'héritabilité afin de confirmer l'origine parentale de la résistance et de mieux apprécier le niveau d'héritabilité de celle-ci.

CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'étudier la possibilité de sélectionner des cannes à sucre résistantes au SCYLV, un virus pouvant potentiellement induire de lourdes pertes de rendements aux producteurs, tout en tenant compte de la diversité virale existant en Guadeloupe. Pour atteindre ce but, 2 expérimentations ont été mises en place. La première, menée sur un grand nombre de variétés de canne à sucre, avait pour but d'étudier la possibilité d'effectuer des études d'association pangénomiques afin de mettre en évidence des marqueurs moléculaires de résistance au SCYLV. La deuxième étude, menée sur des croisements de cannes à sucre issues de la 1^{ère} partie, avait pour but d'étudier l'impact de la diversité du SCYLV existant en Guadeloupe sur la résistance au SCYLV et la transmission de cette résistance des géniteurs aux descendances.

La première partie de l'étude a été menée sur 189 variétés de cannes à sucre représentatives de la diversité moderne mondiale. Quatre types d'échantillonnages (incidences et densités virales des feuilles et des tiges) ont été étudiés et associés à 4189 marqueurs moléculaires (DArT et AFLP). Six marqueurs moléculaires de résistance (3 DArT et 3 AFLP) ont été mis en évidence. Les séquences des marqueurs DArT ont été alignées sur celles du sorgho et les fonctions potentielles de certains gènes liés à ces séquences ont été obtenues sur *Arabidopsis thaliana*.

La deuxième partie de l'étude a été menée sur une dizaine de croisements de 14 variétés de cannes à sucre issues de la 1^{ère} partie de l'étude. La transmission de la résistance au SCYLV a été étudiée en tenant compte de sa diversité existant en Guadeloupe. Malgré le fait que les géniteurs et leurs descendances aient été soumis à des environnements différents, des héritabilités de valeurs moyennes de la résistance ont été mises en évidence avec des corrélations très significatives entre parents moyens et descendants. La transmission de la résistance semble surtout se transmettre par le géniteur mâle. Cependant il faut tenir compte essentiellement du génotype CUB, qui englobe la résistance au génotype REU, et dans une moindre mesure du génotype BRA-PER, pour sélectionner des cannes à sucre résistantes aux SCYLV en Guadeloupe.

L'ensemble de l'étude montre qu'il existe une résistance génétique au SCYLV et que cette résistance se transmet effectivement aux descendances. Il serait intéressant de développer l'étude sur l'implication dans la résistance et la transmission des gènes mis en évidence en réalisant des analyses QTL sur des descendances biparentales. D'autres gènes de résistance au SCYLV peuvent être mis en évidence en générant d'autres marqueurs afin de mieux couvrir le génome de la canne à sucre. Des gènes ainsi que leur fonction peuvent aussi être recherchées dans les marqueurs de

résistance DArT, à faible fréquences, non détectés dans cette étude. Des études d'associations pangénomiques similaires peuvent être menées sur d'autres maladies de la canne à sucre afin de mettre en évidence des marqueurs de résistance utile pour la création variétale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abdeleim I. EAI, Weig A.R., Komor E.: Molecular characterization of Hawaiian Sugarcane yellow leaf virus genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries, *European Journal of Plant Pathology* 2011, 129:399-412
2. Abu Ahmad Y. RL, Royer M., Borg Z., Braithwaite K.S., Mirkov T.E., Irej M.S., Perrier X., Smith G.R., Rott P.: Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion, *Archives of virology* 2006, 151:1355-1371
3. Ahmad YA, Costet L, Daugrois JH, Nibouche S, Letourmy P, Girard JC, Rott P: Variation in infection capacity and in virulence exists between genotypes of Sugarcane yellow leaf virus, *Plant Dis* 2007, 91:253-259
4. Ahmad YA, Royer M, Daugrois JH, Costet L, Lett JM, Victoria JI, Girard JC, Rott P: Geographical distribution of four Sugarcane yellow leaf virus genotypes, *Plant Dis* 2006, 90:1156-1160
5. Aljanabi S. PY, Kross H., Dhayan S., Saumtally S., Ramdoyal K., Autrey L., Dookun-Saumtally A.: Identification of a major quantitative trait locus (QTL) for yellow spot (*Mycovellosiella koepkei*) disease resistance in sugarcane, *Molecular breeding* 2007, 19:1-14
6. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic acids research* 1997, 25:3389-3402
7. Asnaghi C, Roques D, Ruffel S, Kaye C, Hoarau JY, Télismart H, Girard J, Raboin L, Risterucci A, Grivet L: Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers, *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2004, 108:759-764
8. Breseghello F, Sorrells ME: Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, *Genetics* 2006, 172:1165-1177
9. Brown C, Corsini D, Pavék J, Thomas P: Heritability of field resistance to potato leafroll virus in cultivated potato, *Plant breeding* 1997, 116:585-588

10. Burnquist WL., Vega J.: Sugarcane diseases in southern Brazil: a brief report. Edited by Croft BJ PC, Wallis ES, Hogarth DM., Canberra, Australia, ACIAR, 1996, p. pp. 59-61
11. Cardon LR, Bell JI: Association study designs for complex diseases, *Nature Reviews Genetics* 2001, 2:91-99
12. Chao C.P., Hoy JW, Saxton AM, Martin FA: Heritability of resistance and repeatability of clone reactions to sugarcane smut in Louisiana, *Phytopathology* 1990, 80:622-626
13. Comstock J, Miller J, Schnell R: Incidence of Sugarcane yellow leaf virus in clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at the United States National Repository in Miami, Florida, *Sugar Tech* 2001, 3:128-133
14. Cordeiro G, Amouyal O, Elliott F, Henry R: Sugarcane, Pulses, sugar and tuber crops 2007, 175-203
15. D'Arcy C, Domier L, Mayo M: Family Luteoviridae. Edited by CM Fauquet MM, J. Maniloff, U. Desselberger, LA Ball. . San Diego, Elsevier, 2005, p. pp. 891-900
16. D'Hont A.: Unravelling the genome structure of polyploids using GISH and FISH; examples of sugarcane and banana., *Cytogenetic and genome research* 2005, 109:27-33
17. D'Hont A. ID, Alix K., Roux C., Glaszmann J.C.: Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes, *Genome* 1998, 41:221-225
18. Daugrois J, Grivet L, Roques D, Hoarau J, Lombard H, Glaszmann J, D'Hont A: A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570', *TAG Theoretical and Applied Genetics* 1996, 92:1059-1064
19. Daugrois J, Jean-Baptiste I, Lockhart B, Irej M, Chatenet M, Rott P: First report of sugarcane yellow leaf virus in the French West Indies, *Plant Dis* 1999, 83:588-588
20. Daugrois JH, Edon-Jock C, Bonoto S, Vaillant J, Rott P: Spread of Sugarcane yellow leaf virus in initially disease-free sugarcane is linked to rainfall and host resistance in the humid tropical environment of Guadeloupe, *European Journal of Plant Pathology* 2011, 129:71-80

21. Davis M.J. DJL, Miller J.D., Shine J.M.: A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane, *Sugar Cane* 1994, 6:9-16
22. Dufour P, Deu M, Grivet L, D'hont A, Paulet F, Bouet A, Lanaud C, Glaszmann J, Hamon P: Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid, *TAG Theoretical and Applied Genetics* 1997, 94:409-418
23. Edon-Jock C, Rott P, Vaillant J, Fernandez E, Girard J, Daugrois J: Status of Sugarcane yellow leaf virus in commercial fields and risk assessment in Guadeloupe. Edited by International Society Sugar Cane Technologists (ISSCT), 2007, p. pp. 995-1004
24. Falconer D S.: *Introduction to Quantitative Genetics*. Edited by ed r. New York, John Wiley and Sons, 1989,
25. Fartek B, Nibouche S, Turpin P, Costet L, Reynaud B: Resistance to *Melanaphis sacchari* in the sugarcane cultivar R 365, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2012,
26. Fauconnier R.: *La canne à sucre*. Edited by 1991, p.pp. 165
27. Feussner I, Wasternack C: The lipoxygenase pathway, *Annual Review of Plant Biology* 2002, 53:275-297
28. Flint-Garcia SA, Thuillet AC, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES: Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection, *The Plant Journal* 2005, 44:1054-1064
29. Fütterer J, Hohn T: Translation in plants-rules and exceptions, *Plant molecular biology* 1996, 32:159-189
30. Gao SJ, Lin YH, Pan YB, Damaj MB, Wang QN, Mirkov TE, Chen RK: Molecular characterization and phylogenetic analysis of Sugarcane yellow leaf virus isolates from China, *Virus genes* 2012, 1-10
31. Gildow F, Harris K: Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids, *Current topics in vector research* Vol 4 1987, 93-120

32. Grisham M, Pan Y, Legendre B, Godshall M, Eggleston G: Effect of sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and juice quality. Edited by Australian Society of Sugar Cane Technologists, 2001, p. pp. 434-438
33. Grivet L. DHA, Roques D., Feldmann P., Lanaud C., Glaszmann J.C.: RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid, *Genetics* 1996, 142:987-1000
34. Hamblin MT, Fernandez MGS, Casa AM, Mitchell SE, Paterson AH, Kresovich S: Equilibrium processes cannot explain high levels of short-and medium-range linkage disequilibrium in the domesticated grass *Sorghum bicolor*, *Genetics* 2005, 171:1247-1256
35. Harrison BD: Virus variation in relation to resistance-breaking in plants, *Euphytica* 2002, 124:181-192
36. Heller-Uszynska K, Uszynski G, Huttner E, Evers M, Carlig J, Caig V, Aitken K, Jackson P, Piperidis G, Cox M: Diversity arrays technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane, *Molecular breeding* 2011, 28:37-55
37. Hoarau J.Y. OB, D'Hont A., Risterucci A.M., Roques D., Glaszmann J.C., Grivet L. DHA, Roques D., Feldmann P., Lanaud C., Glaszmann J.C.: Genetic dissection of a modern cultivar (*Saccharum* spp). I. Genome mapping with AFLP., *Theoretical and Applied Genetics* 2001, 103:84–97
38. Jannoo N. GL, Dookun A., D'Hont A., Glaszmann JC.: Linkage disequilibrium among modern sugarcane cultivars, *Theoretical and Applied Genetics* 1999, 99:1053-1060
39. Jeswiet J.: The development of selection and breeding of the sugarcane in Java. Edited by Surabaya, Java, The executive Committee, 1929, p. pp. 45-57
40. Kempthorne O: An Introduction to Genetic Statistics. Edited by 1957,
41. Komor E: Susceptibility of sugarcane, plantation weeds and grain cereals to infection by Sugarcane yellow leaf virus and selection by sugarcane breeding in Hawaii, *European Journal of Plant Pathology* 2011, 129:379-388

42. Komor E, ElSayed A, Lehrer A: Sugarcane yellow leaf virus introduction and spread in Hawaiian sugarcane industry: Retrospective epidemiological study of an unnoticed, mostly asymptomatic plant disease, *European Journal of Plant Pathology* 2010, 127:207-217
43. Kraakman ATW, Martinez F, Mussiraliev B, Van Eeuwijk F, Niks R: Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars, *Molecular breeding* 2006, 17:41-58
44. Lehrer AT. MF, Moore PH., Komor E.,: Movement of ScYLV and impact of its infection on performance and physiology of the sugarcane plant. Edited by Cha-am, Thailand, 2000, p. pp. p Ph-6
45. Lockhart B, Cronje CPR: Yellow leaf syndrome, A guide to sugarcane diseases 2000, 291-295
46. Massman J, Cooper B, Horsley R, Neate S, Dill-Macky R, Chao S, Dong Y, Schwarz P, Muehlbauer G, Smith K: Genome-wide association mapping of Fusarium head blight resistance in contemporary barley breeding germplasm, *Molecular breeding* 2011, 27:439-454
47. Matsuoka S, Meneghin S: Yellow leaf syndrome and alleged pathogen: casual and not causal relationship. Edited by 1999, p. pp. 382-389
48. McLaren N: Quantifying resistance of sorghum genotypes to the sugary disease pathogen (*Claviceps africana*), *Plant Dis* 1992, 76:986-988
49. Moonan F, Molina J, Mirkov TE: Sugarcane Yellow Leaf Virus: An Emerging Virus That Has Evolved by Recombination between Luteoviral and Poleroviral Ancestors, *Virology* 2000, 269:156-171
50. Nalam VJ, Keeretaweeep J, Sarowar S, Shah J: Root-derived oxylipins promote green peach aphid performance on *Arabidopsis* foliage, *The Plant Cell Online* 2012, 24:1643-1653
51. Perrier X, Jacquemoud-Collet J: DARwin software, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France 2006,
52. Raboin L.M. OKM, Lecunff L., Telismart H., Roques D., Butterfield M., Hoarau J.Y., D'Hont A.: Genetic mapping in the high polyploid sugarcane using a bi-parental progeny;

identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene., Theoretical and Applied Genetics 2006, 112:1382–1139

53. Raboin LM, Pauquet J, Butterfield M, D'Hont A, Glaszmann JC: Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane, TAG Theoretical and Applied Genetics 2008, 116:701-714

54. Ramdoyal K, Sullivan S, Lim Shin Chong L, Badaloo G, Saumtally S, Domaingue R: The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations, TAG Theoretical and Applied Genetics 2000, 100:557-563

55. Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, Chaume J, Irey MS, Lockhart BEL, Kodja H, Rott P: Impact of <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> on Sugarcane Yield and Juice Quality in Réunion Island, European Journal of Plant Pathology 2003, 109:459-466

56. Rocher S.: Etudes d'associations pan-génomiques chez la canne à sucre (*Saccharum* spp.). Edited by Montpellier, France, L'UNIVERSITE DE MONTEPELLIER 2, 2011, p. 124

57. Rossi M. APG, PAulet F., Garsmeur O., Dias V.M., Chen H., Van Sluys M.A., D'Hont A., Ison D., Alix K., Roux C. and Glaszmann J.C.: Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane., Molecular Genetics and Genomics 2003, 269:406-419

58. Rott P. BRA, Comstock J.C. , Croft B.J., Saumtally A.S.: A guide to sugarcane disease. Edited by 2000, p.pp. 339

59. Schenck S, Hu J, Lockhart B: Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of *sugarcane yellow leaf virus* in Hawaii, Sugar Cane 1997, 4:5-8

60. Stevenson GS: Genetics and breeding of sugar cane. Edited by London, UK., Longmans, 1965,

61. Thiébeauld O, Pooggin MM, Ryabova LA: Alternative translation strategies in plant viruses, Plant Viruses 2007, 1:1-20

62. van der Wilk F, Houterman P, Molthoff J, Hans F, Dekker B, van den Heuvel J, Huttinga H, Goldbach R: Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants, *Molecular plant-microbe interactions* 1997, 10:153-159
63. Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC: Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus, *Plant Dis* 1997, 81:21-26
64. Viswanathan R, Balamuralikrishnan M, Karuppaiah R: Identification of three genotypes of sugarcane yellow leaf virus causing yellow leaf disease from India and their molecular characterization, *Virus genes* 2008, 37:368-379
65. Walker DIT: Breeding for disease resistance. Edited by Heinz DJ. Amsterdam, Elsevier, 1987, p. pp. 455–502
66. Wang M, Xu D, Li R, Zhou G: Genotype identification and genetic diversity of Sugarcane yellow leaf virus in China, *Plant Pathology* 2012,
67. Wang MQ, Zhou GH: A near-complete genome sequence of a distinct isolate of Sugarcane yellow leaf virus from China, representing a sixth new genotype, *Virus genes* 2010, 41:268-272
68. Wei X, Jackson PA, McIntyre CL, Aitken KS, Croft B: Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure, *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2006, 114:155-164
69. Wei X JP, Hermann S, Kilian A, Heller-Uszynska K, Deomano E.,: Simultaneously accounting for population structure, genotype by environment interaction, and spatial variation in marker-trait associations in sugarcane., *Genome* 2010, 53:973-981
70. Yin Z, Hoy J, Milligan S: Evaluation and heritability of resistance to sugarcane red rot, *Phytopathology* 1996, 86:662-667
71. Zhang Z, Ersoz E, Lai CQ, Todhunter RJ, Tiwari HK, Gore MA, Bradbury PJ, Yu J, Arnett DK, Ordovas JM: Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies, *Nature genetics* 2010, 42:355-360
72. Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J: Status and prospects of association mapping in plants, *The plant genome* 2008, 1:5-20

73. Zhu C, Yu J: Nonmetric multidimensional scaling corrects for population structure in association mapping with different sample types, *Genetics* 2009, 182:875-888
74. Ziegler-Graff V, Brault V, Mutterer J, Simonis M, Herrbach E, Guilley H, Richards K, Jonard G: The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission, *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* 1996, 9:501-510

TRAVAUX PUBLIES

Ces travaux ont été présentés à :

1. Daugrois J.H., Debibakas S., 2012. How does SCYLV genetic diversity impact sugarcane disease resistance and breeding. ISSCT, X Plant Pathology Workshop, Mai, 7-11, Nanning, China
2. Fartek B., Rocher S, Debibakas S., Hervouet C, Royeart S., Toubi L, Roques D, Daugrois J.H., D'hont A., Hoarau J.Y., Nibouche S. and Costet L. 2011, Association mapping of sugarcane resistance to the sugarcane yellow leaf disease. 7th ISSCT Molecular Biology Workshop, 15-20 May 2011, Maceio, Brazil.
3. Débibakas S., Rocher S., Hoarau J.-Y., Daugrois J.H 2011 Résistance de la canne à sucre au SCYLV : du phénotypage d'une core collection à l'identification de marqueurs génétiques. 13^{ème} rencontre de virologie végétale, 16-20 janvier 2011, Aussois, France
4. Débibakas S., Rocher S., Hoarau J.-Y., Daugrois J.H 2010. Exploring feasibility and reliability of rating for resistance to *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) in a core collection of sugarcane. 9th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and 6th congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Evora, Portugal, Nov 15-18, 2010.
5. Daugrois Jean Heinrich, Debibakas Sarah, Fernandez Emmanuel, Girard Jean-Claude and Rott Philippe, 2010. Variation in sugarcane cultivar host range of Sugarcane yellow leaf virus genotypes in Guadeloupe XIth International Plant Virus Epidemiology Symposium, 20-24, June, 2010. Cornell University. Ithaca, New York

Article soumis:

Genome wide association study for sugarcane resistance to *Sugarcane yellow leaf virus*.

S. Debibakas, S. Rocher, O. Garsmeur, D. Roques, A. D'Hont, J.-Y. Hoarau, and J. H. Daugrois